



Universidade de Brasília – UnB
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Papel Imunomodulador de Poliedros do Baculovírus AcMNPV

Camila Tavares

Orientadora: Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília, DF
2018

CAMILA TAVARES

**Papel Imunomodulador
dos Poliedros de Baculovírus
de AcMNPV**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como pré-requisito para obtenção de Título de Doutora em Patologia Molecular.

Orientadora: Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília, DF
2018

Tese de autoria de Camila Tavares intitulada “**Papel Imunomodulador dos Poliedros de Poliedros de AcMNPV**”, apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular da Universidade de Brasília em 6 de Dezembro de 2018, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca
Universidade de Brasília – UnB Orientadora

Dr. Aldo Henrique Tavares
Universidade de Brasília – UnB Avaliador

Dr. Athos Oliveira
Universidade de Brasília – UnB Avaliadora

Dra. Simone Fonseca
Universidade de Brasília – UnB Avaliadora

Brasília, DF
2018

...e quando estiver cinza,
pense que vai passar e quando
passar agradeça a vida pela
travessia.

Dedico este trabalho a Deus, minha sempre *batalhadora* mãe *Divina*, minha irmã Sara e a *Wânia Souza*.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus nesses anos de desenvolvimento do doutorado. Com certeza nada seria possível sem a benção Dele.

Agradeço a Wânia Souza. Foram anos de muito aprendizado, companheirismo, incentivo e esforços. Muito obrigada por todo o apoio, suporte, críticas construtivas, lágrimas e compreensão. **Sou eternamente grata!**

Agradeço a minha mãe, Divina Izolina Tavares pelo apoio e suporte apostando nos meus estudos e sonhos. **Minha gratidão eterna!**

Agradeço a minha amiga Jacyelle, por todo o carinho, ajuda e conselhos. **Amiga sou eternamente grata pela sua amizade!**

Agradeço a minha orientadora **professora Anamélia Bocca**, por proporcionar a realização deste trabalho que me trouxe um grande crescimento pessoal e oportunidades para a minha carreira científica. Serei grata aos ensinamentos científicos quanto pessoal adquiridos pela senhora nesses últimos anos. Muito obrigada!

Agradeço a professora Simone Fonseca pelo estágio em seu laboratório de Imunoregulação o que me proporcionou grande crescimento científico e pessoal.

Aos professores membros da banca de qualificação, prof. Aldo, prof. Ildinete e Athos. Todas as sugestões e correções foram de imensa valia para este trabalho. Meu muito obrigada pela contribuição. O mesmo para os membros da banca de defesa deste doutorado. Obrigada por aceitarem o convite e dividirem seus conhecimentos e observações.

Também quero agradecer a dr. Aldo, por todas as conversas construtivas, além do apoio científico deste trabalho. Muito obrigada!

Obrigada ao professor Bergmann Ribeiro e ao Leonardo da Silva pela colaboração para a realização do meu doutorado.

Agradeço a toda a família UnB, ao Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA), começando pelo professor Aldo Tavares, pelos ensinamentos e discussões nos seminários. A professora Larissa, por dividir seus ensinamentos, reagentes e equipamentos. Ao técnico Chiquinho, dando aquela força no nitrogênio ou na autoclave quando eu me esquecia. Aos queridos colegas de trabalho: Mariana (pela sincera amizade, orientação, conversas – sem você tudo teria sido mais difícil) Angelina, Samyra, Karina (pelo carinho e atenção), Paulo e Pedro (Obrigada pelas orientações técnicas), Camilly (Obrigada pela companhia), Fabiana (Obrigada pelas conversas e ensinamentos – muita admiração). Obrigada a todos por me ajudarem compartilhando conhecimento, jogando conversa fora ou simplesmente dividindo tarefas.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pelo apoio financeiro.

Sumário

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Produção do Poliedro	25
3.2. Camundongos	25
3.3. Análises in vitro	26
3.3.1. Obtenção de Células Dendríticas e Macrófagos derivados de medula óssea	26
3.3.2. Ensaio de Viabilidade Celular	27
3.3.3. Marcação de Moléculas Co-estimulatórias em Células Dendríticas Após o Estímulo com Poliedro	28
3.3.4. Internalização dos Poliedros pelas Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea	28
3.3.5. Ensaio de PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) em Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea Estimuladas com Poliedro	29
3.3.6. Obtenção de Linfócitos T a Partir da cultura de Esplenócitos Totais	30
3.3.7. Marcação de Linfócitos T ou Esplenócitos com CFSE.....	31
3.3.8. Cocultura de Linfócitos com Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea	31
3.3.9. Avaliação da Produção de Citocinas e Quimiocina por Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA).....	32
3.4. Análises in vivo.....	32
3.4.1. Imunização dos Camundongos	32
3.4.2. Avaliação da Proliferação de Esplenócitos ex- vivo.....	33
3.4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para Dosagem de IgG1 e IgG2a	34
3.5. Análise estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Estimulação dos Macrófagos Derivados de Medula Óssea (BMDM) pelo Poliedro	36
4.2. Internalização do Poliedro pelas Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea (BMDC)	36
4.3. Efeito Citotóxico dos Poliedros nas BMDC	35
4.4. O Poliedro Induz a Alterações funcionais em BMDC	37
4.5. As Células Dendríticas Estimuladas com o Poliedro são Capazes de Induzir a Proliferação de Linfócitos T	40
4.6. O Poliedro é Capaz de Induzir Aumento da Produção de IL-17 in vitro	41
4.7. Os receptores TLR2 e TLR4 são importantes na produção de citocinas inflamatórias em BMDCs estimuladas com o Poliedro	42
4.8. Os receptores TLR2 e TLR4 interferem com a Proliferação dos Linfócitos T ...	44
4.9. O Poliedro é Capaz de Induzir a Expressão dos Genes envolvidos na produção de IFN- α	45
4.10. A Imunização com o Poliedro Induziu um Aumento na Proliferação Celular,	

Produção Citocinas e de IgG2a in vivo.....	47
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS	60
LISTA DE ABREVIATURAS.....	66
LISTA DE ANEXOS	68
LISTA DE FIGURAS	69
LISTA DE TABELAS.....	72
8. ANEXOS.....	73

RESUMO

Baculovírus são vírus de DNA de dupla fita circular que infectam insetos. O potencial destes vírus como ferramenta para expressão de proteínas heterólogas começou a ser explorado na década de 70. Hoje, os baculovírus são utilizados amplamente para expressar antígenos de uso vacinal, diagnóstico e como potenciais vetores de terapia gênica e vacinas de DNA. Sabendo que a forma BV (Budded virus) de AcMNPV (*Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*) induz alterações fenotípicas e funcionais em células da resposta imune inata e adaptativa, despertou-se o interesse do nosso grupo em saber se a forma OB (Occlusion Body) de AcMNPV, também conhecido como poliedros, apresenta a capacidade de estimular tanto a resposta imune inata como a adaptativa. Genes de interesse podem ser fusionadas ao gene da poliedrina, a proteína mais abundante do poliedro, o que permite assim sua produção de proteínas recombinantes em alta concentração. Neste presente trabalho foi avaliado a capacidade do poliedro de AcMNPV em estimular a resposta imune do hospedeiro saudável, apresentando uma ação imunomoduladora. Os resultados *in vitro* mostraram que o poliedro é capaz de induzir a maturação das células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) observado pelo aumento da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-12), quimiocina (CCL2), aumento da expressão de moléculas coestimulatória (CD80, CD86) e MHC-II. O poliedro foi capaz de ativar vias de sinalização intracelular semelhante ao observado por vírus com o aumento da transcrição dos genes. Além disso, observou-se a ativação de células da resposta imune adaptativa com aumento da proliferação celular com indução de um perfil mixto. Estes dados nos permite concluir que a fusão de proteínas de interesse fusionadas à poliedrina é uma estratégia interessante, não sendo necessária a utilização de adjuvantes nas estratégias de vacinas terapêuticas ou profiláticas.

Palavras chave: Poliedros de AcMNPV, Imunomodulador, imunidade inata e adaptativa.

ABSTRACT

Baculoviruses are circular double-stranded DNA viruses that infect insects. The potential as an implement for heterologous proteins expression began to be explored in the 70'. Today, baculoviruses are widely used to express vaccine antigens, to diagnosis and as potential gene therapy vectors and DNA vaccines. It is already reported in the literature that the BV form of AcMNPV induces phenotypic and functional changes in cells of the innate and adaptive immune response. In this way, our group's interest in knowing whether the OBs form of AcMNPV, also known as polyhedra, has been shown to have the ability to stimulate the innate and adaptive immune responses. Proteins of interest can be fused to the polyhedrin gene, the most abundant protein of the polyhedron, which allows its production in high concentration. This study evaluated if the polyhedron of AcMNPV is able to exert immunomodulatory action. The *in vitro* results showed that the polyhedron is capable of inducing maturation of the BMDCs cells, which is observed by increased production of inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-12), chemokine (CCL2), increased expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86) and MHC-II. The polyhedron was able to activate intracellular signaling pathways, like those observed by viruses with increased transcription of TLR3, TLR9, IRF3 and IFN- α . In addition, it was through the activation of the BMDCs that it provided the activation of adaptive immune response cells with increased cell proliferation with induction of a mixed profile. These data allow us to conclude that the fusion of proteins of interest fused to polyhedrin is an interesting strategy and there is no need for the use of adjuvants in the strategies of therapeutic or prophylactic vaccines.

Keywords: Polyhedra of AcMNPV, Immunomodulator, innate and adaptive immunity.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a utilização de imunomoduladores tem sido alvo de vários estudos, como nas terapias antitumorais, adjuvantes de vacinas, regulação de processos inflamatórios entre outros. Diversas substâncias têm apresentado este papel e a associação dessas substâncias com proteínas recombinantes tem despertado especial interesse. Um dos sistemas que permite a produção das proteínas recombinantes fusionadas com uma proteína imunomoduladora é o do baculovírus, cuja proteína de interesse é fusionada à poliedrina. No presente trabalho avaliamos a capacidade do poliedro de AcMNPV em ativar células da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa.

Baculovírus

Os baculovírus são vírus que infectam mais de 700 espécies de insetos pertencentes às ordens *Díptera*, *Hymenoptera*, principalmente, *Lepidoptera*. Os baculovírus pertencem a família *Baculoviridae* que de acordo com análise filogenética de proteínas virais, são divididos em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* (NPV - Nucleopolyhedrovirus), *Betabaculovirus* (GV - *Granulovirus*), *Gammabaculovirus* (NPV) e *Deltabaculovirus* (NPV) (Jehle, *et al.*, 2006), considerando as características morfológicas do corpo de oclusão (*occlusion body* - OB) (Zonotto *et al.*, 1993).

Os baculovírus possuem capsídeo de 40-50 nm de diâmetro e 200-400 nm de comprimento, podendo alterar sua conformação para acomodar o seu genoma que é composto de DNA dupla fita, circular, variando de 80 a 200 kilobases (Kb), que codifica 90 a 181 genes, aproximadamente. O capsídeo viral é constituído por uma estrutura protéica em forma de bastão, formando o nucleocapsídeo que por sua vez é envolvido pelo envelope composto por uma bicamada lipídica (Figura 1). Os baculovírus depositam em torno do envelope uma matriz proteica à base de poliedrina ou granulina, conhecida como poliedro e grânulo, respectivamente (Rohrmann, 2014). O poliedro produzido pela espécie de baculovírus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), pode conter várias partículas virais em pequenos grupos, envolvidas pela estrutura cristalina que apresenta um diâmetro de 10 nanômetros (nm) (Miller, 1997).

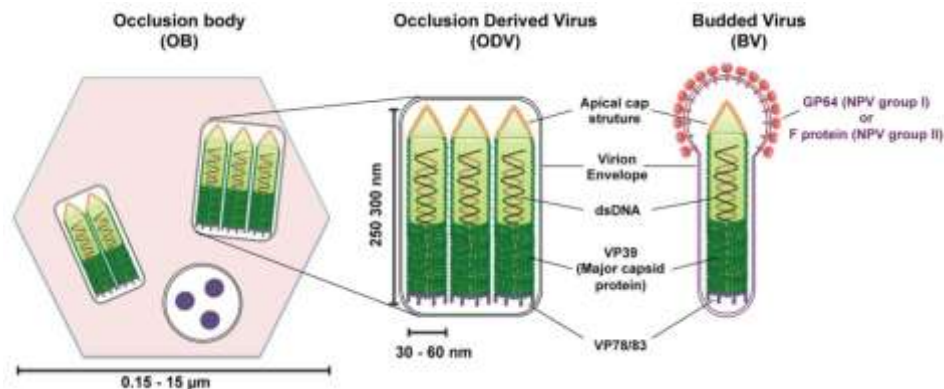


Figura 1. Fenótipos de baculovírus. O baculovírus pode apresentar os seguintes fenótipos: o corpo de oclusão (Occlusion Body - OB) também conhecido como poliedro, o vírus derivado da oclusão (occlusion derived virus - ODV) e o vírus brotado (Budded virus - BV). Fonte: figura modificada de Panté, 2013.

Os baculovírus apresentam fenótipos distintos, contendo o mesmo genoma, mas diferem na morfogênese, composição dos envelopes e função dentro do ciclo de infecção viral. Em relação a morfologia dos AcMNPV existem as formas: o BV e o ODV. O BV é encontrado nas células e tecidos de insetos e são formados na fase inicial da infecção, cuja constituição de seu envelope é derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, modificada por proteínas de fusão virais, como GP64 ou proteína F. Por outro lado, ODV é o fenótipo viral protegido por uma matriz cristalina, denominada poliedro, cujas estruturas, foram formadas integralmente no núcleo agrupando uma ou várias partículas virais (Figura 1) (Rohrmann, 2013).

Os ODVs podem formar os corpos de inclusão (OB). Estes são constituídos por aproximadamente 95% de poliedrina (POL) dentre todas as proteínas totais (Jarvis, 1997). Os grânulos contêm uma única partícula viral, enquanto os poliedros contêm múltiplos vírus envelopados em conjunto (MNPV) ou separadamente (SNPV). Apesar da uniformidade do cristal de poliedrina, os ODVs estão distribuídos aleatoriamente no interior dos OBs (Figura 2) (Manning, 1988).

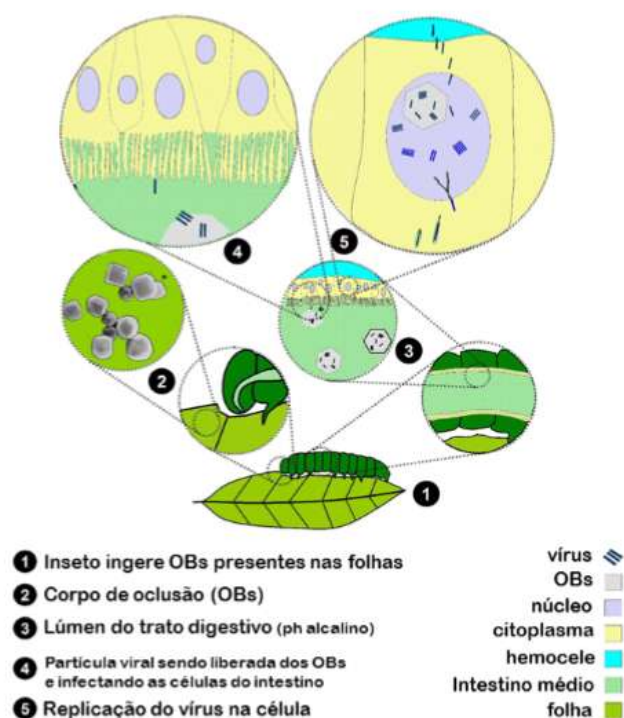


Figura 2. O ciclo de infecção de um baculovírus do grupo nucleopoliedrovírus (NPV) em um hospedeiro lepidóptero. Na fase 1 e 2 ocorre a ingestão de OBs pelo inseto; nas fases 3 e 4, devido ao pH alcalino do intestino médio, ocorre a dissolução da matriz proteica do OB e liberação dos ODVs e enzimas. Estes ODVs, com auxílio das enzimas, rompem e cruzam a membrana peritrófica do lúmen intestinal, estabelecendo assim, a infecção de células epiteliais do intestino médio. Na fase 5, após ocorrer o primeiro ciclo de replicação viral no núcleo dessas células, a produção de BVs se inicia, e em sequência, BVs são transportados para outros tecidos, via hemolinfa e traqueia, espalhando a infecção para todo o inseto (adaptado de Silva, 2016).

Na natureza, os OBs podem estar em plantas que servem de alimento para lagartas. Após a ingestão dos poliedros, no intestino médio das lagartas eles são dissolvidos e os ODVs se fundem às células colunares do epitélio intestinal, por meio de proteínas de fusão do envelope viral. Após a internalização, os nucleocapsídeos são liberados e migram para o núcleo da célula hospedeira. Os BVs são formados e migram em direção a membrana basal, dando início a infecção sistêmica (Rohrmann, 2013). Em períodos tardios da infecção viral, vírions são oclusos nos corpos de oclusão dentro do núcleo das células infectadas e são liberados no ambiente após a morte e desintegração do inseto (Ribeiro, *et al.*, 2016).

A regulação da expressão gênica dos baculovírus pode ser dividida em fase precoce, fase tardia e fase muito tardia (Maruniak, 1986). Na fase precoce a maioria das enzimas utilizadas na replicação do vírus é proveniente da célula hospedeira (Slack & Arif, 2007). Na

fase tardia que inicia de 6 a 18 horas após a infecção, ocorre a replicação do DNA viral, com a formação do fenótipo BV (Silveira, *et al.*, 2007). Por fim, na fase muito tardia que ocorre a partir de 18 horas, observa-se a expressão de genes envolvidos na formação do vírus ocluso (poliedro). Os principais genes envolvidos são *polh* e *p10* (Slack & Arif, 2007). Os elevados índices de expressão na fase muito tardia, chamou a atenção de pesquisadores que passaram a usar os promotores do gene da POL para expressar proteínas de interesse de diferentes organismos (Ribeiro, 2016). O genoma do baculovírus foi manipulado, transformando-os em um eficiente sistema de expressão de proteínas heterólogas, no qual o gene de interesse é fusionado ao gene *pol* ou expresso sob o comando do promotor da poliedrina em que após a transfecção em células de inseto, forma-se os poliedros (Ardisson-Araújo *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 1983). A eficiência de expressão neste sistema foi desenvolvida por Luckow e colaboradores (1993) (Hitchman, 2009).

O AcMNPV é o baculovírus mais estudado até o momento e os vetores de expressão comerciais são baseados nesse vírus (Reilly *et al.*, 1992). O AcMNPV foi utilizado como vetor de expressão nos primeiros trabalhos, cuja finalidade foi a produção de interferon e β -galactosidase em culturas de células de *Spodoptera frugiperda* (Smith, *et al.*, 1983). O seu potencial como vetor de expressão de proteínas heterólogas, bem como a utilização de suas proteínas para diferentes fins biotecnológicos, continuam sendo estudados e caracterizados.

Dentre as vantagens para a utilização dos baculovírus como vetores de expressão estão a alta expressão de proteínas heterólogas; possuir diferentes fases na regulação gênica do ciclo viral, oferecendo oportunidade de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições celulares; capacidade para clonagem de grandes inserções; eficiência na expressão de genes eucariotos contendo íntrons e exons e a simplicidade de manipulação (Liu, *et al.*, 2007). Dentro deste contexto, a Agência Europeia de Medicamentos, aprovou o uso de vetores a base de baculovírus para a produção de vacinas, proporcionando condições para a utilização do baculovírus, como também na terapia gênica (Airene, 2010), uma vez que são incapazes de se proliferarem em células de mamíferos, devido à ausência de proteínas relacionadas com a replicação e transcrição gênica (Abe, *et al.*, 2005).

Caracterização da Poliedrina (POL) e do Poliedro

O sistema de expressão de proteína heteróloga produzida pelos baculovírus pode

utilizar a estratégia de fusão à POL o que torna importante o melhor conhecimento desta proteína. A POL tem um peso molecular de aproximadamente 29 quilo dalton (kDa), com 245 aminoácidos. De acordo com análise cristalográfica essa proteína é dividida em três regiões: cabeça N-terminal, um corpo em forma de cone (compreendendo a maioria da subunidade) e cauda C- terminal. O corpo é a região mais conservada, sendo que a primeira estrutura estendida contém quatro beta-folhas. Já a segunda região estendida é constituída por alças ($\alpha 2$, $\alpha 3$ e Z2) com núcleo hidrofóbico. Enquanto a região C-terminal contém 13 resíduos altamente conservados. Segundo análise cristalográfica da POL os dodecaedros interagem entre si por meio de interações iônicas ou hidrofóbicas para formar o poliedro (Figura 3) (Ji, *et al.*, 2010).

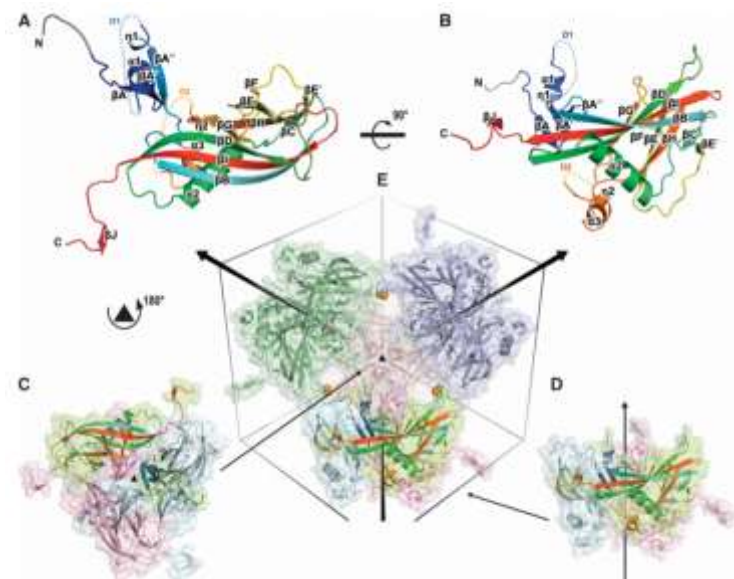


Figura 3. Visão geral da estrutura da poliedrina. (A, B) A estrutura da poliedrina AcMNPV, em duas vistas ortogonais, mostrada como representações de desenhos colorido de azul a região N terminal para vermelho a região C-terminal. Os resíduos 3 a 7 são desenhados em cinza. Desordenado os segmentos D1 (resíduos 32 a 48) e D2 (resíduos 174 a 186) são mostrados como pontos. (C, D) Desenhos e representações de superfície de trimeros de poliedrina mostrado em duas orientações alinhadas para (E). As subunidades são coloridas por uma cadeia em cada trimer colorido como em (A). (E) unidade dodecamérica de quatro trimeros ligados por ligações dissulfeto (representados como esferas laranjas). A célula unitária e os eixos triplos são desenhados para facilitar a observação (Modificado de Gouet *et al.*, 1999).

O poliedro é uma estrutura altamente estável e resistente a solubilização, exceto quando presente em um meio alcalino, protegendo os ODVs de diferentes condições ambientais (Rohrmann, 1986; Van & Vlak, 1997). Em relação a organização do poliedro, as subunidades de AcMNPV formam trimeros bem compactados que se assemelham a estrutura de um cubo com um quadrante removido (região em que localiza as partes desordenadas da

molécula) (Figura 4 C, D). As folhas – β de cada subunidade são agrupadas perpendicularmente entre si (Jones, *et al*, 1989), definindo o tamanho deste cubo que originará o cristal de poliedro. No entanto, dado o posicionamento dos eixos de simetria das distâncias envolvidas e a natureza das interações das subunidades é mais provável que a porção N-terminal se ligue a um das subunidades dentro do trímero (Figura 4) (Ji, *et al.*, 2010).

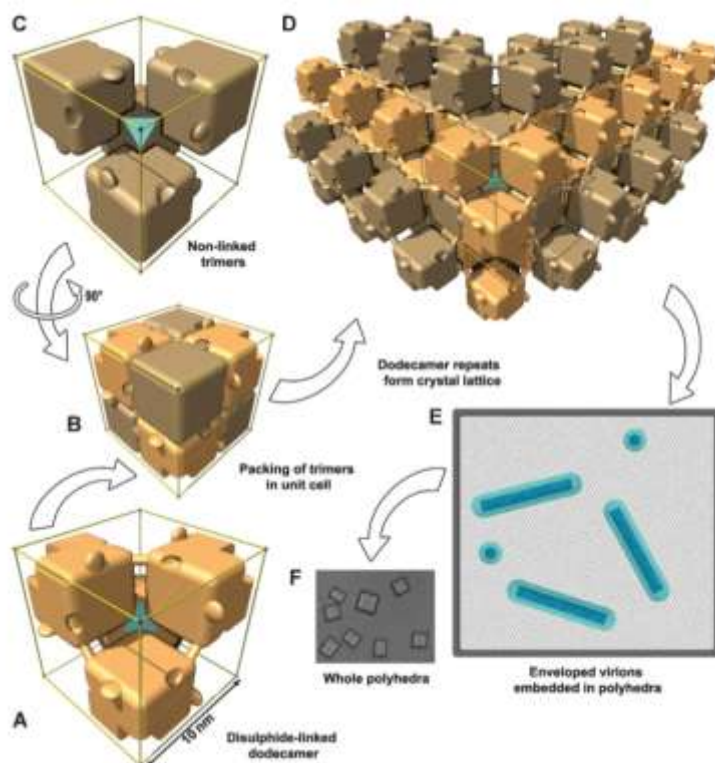


Figura 4. Representações esquemáticas da organização dos poliedros. Os trímeros de poliedrina são representados como blocos cúbicos simplificados, com a região C-terminal e bolsos presentes. Para esclarecer a interpretação, as bordas da célula unitária são mostradas em ouro e um tetraedro azul claro simboliza o centro célula. Dentro de uma célula unitária, os trímeros ligados por dissulfeto com uma polaridade são coloridos de faixa clara (A) e aqueles com polaridade oposta são castanho claro (C). (B) Todos os oito trímeros na célula unitária. A ligação dissulfeto que liga os trímeros adjacentes é mostrada como um pino. (D) O cristal é construído a partir de repetições da unidade dodecamérica. (E) Esboço de uma seção transversal através de um poliedro. Os espaçamentos das células unitárias do cristal são ilustrados como um padrão de pontos nos quais estão incorporados nucleocapsídeos (azul escuro) rodeados por um envelope (azul claro) (Modificado Ji, *et al.*, 2010).

Entrada do Baculovírus em Células de Mamíferos

A forma BV dos baculovírus são capazes de penetrar tanto nas células dos insetos como nas células de mamíferos, utilizando a glicoproteína do envelope, a GP64 (Van, *et al.*, 2001). Embora os receptores necessários para a entrada do baculovírus nestas células não

estejam totalmente elucidados, sabe-se que a proteína GP64 é capaz de se ligar ao proteoglicano de sulfato de heparina (PSH) presente na superfície celular (Duisit, *et al.*, 1999). Além disso, a GP64 pode também interagir com fosfolipídios presentes na membrana celular, sendo que a sua entrada é inibida por tratamento com ácido fosfatídico e fosfatidilinositol (Tani, *et al.*, 2001). Foi sugerido que a internalização ocorre via endocitose mediada por clatrina e/ou a macropinocitose (Long, *et al.*, 2006). No entanto, a internalização via fagocitose também pode ocorrer (Laakkonen, *et al.*, 2009) (Figura 5).

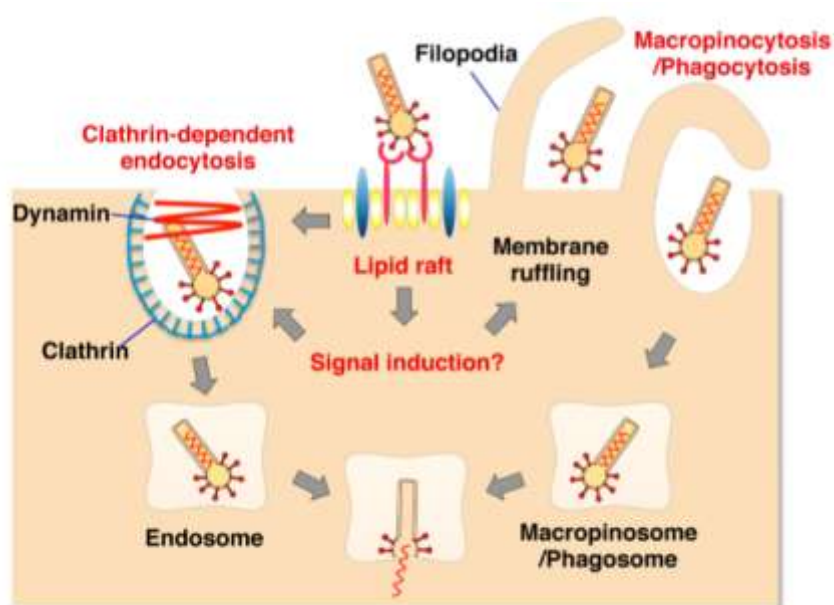


Figura 5. Modelo esquemático de internalização de baculovírus em células de mamíferos. O baculovírus se liga ao(s) receptor(es) celular(es) presente(s) na bicamadalipídica. Essa associação induz a remodelação celular através da transdução de sinal. Na endocitose mediada por clatrina, o baculovírus é internalizado pelo endossoma revestido de clatrina. Na macropinocitose ou na fagocitose, as filóforas formadas pela dinâmica da actina envolvem o baculovírus em um macropinosoma ou fagossoma. O genoma viral é liberado do endossomo, macropinosoma ou fagossoma através de fusão de membrana induzida pH baixo (Modificado de Kataoka, *et al.*, 2012).

Resposta Imune Induzida pelos Baculovírus

O AcMNPV demonstrou capacidade de promover respostas imunes pela produção de interferons (IFNs) e de citocinas pró-inflamatórias (Abe, *et al.*, 2003; Abe, *et al.*, 2005; Beck, *et al.*, 2000). Nas infecções virais observa-se uma resposta imune inata desencadeada pelo reconhecimento do DNA CpG não metilado de AcMNPV por meio de TLR9, resultando na

produção de IFNs tipo I, citocinas inflamatórias e quimiocinas por macrófagos como por células dendríticas (DCs) (Akira, *et al.*, 2001; Akira, *et al.*, 2006).

Mediante a capacidade de ativação do sistema imune da forma BV dos baculovírus aumentou-se o interesse dos pesquisadores de utilização da forma OB como um possível carreador de proteínas, uma vez que proteínas de interesse fusionadas ao gene *pol* pode não alterar a estrutura do poliedro (Fraser, *et al.*, 1989). Estudos já demonstraram que a forma BV de AcMNPV que DCs e macrófagos (MO) de camundongos, assim como MO humanos, são capazes de iniciar uma resposta imune antiviral caracterizada pela produção de interferon do tipo I (IFN-I) e aumento da expressão de marcadores de ativação nessas células (Schutz, *et al.*, 2006; Gronowski, *et al.*, 1999). Além de verificar a proteção contra vírus letais em experimentos *in vivo* (Abe, *et al.*, 2005; Abe, *et al.*, 2003; Gronowski, *et al.*, 1999). Já foi demonstrado que o BV de AcMNPV, possui propriedade adjuvante, induzindo uma resposta humoral e citotóxica mediada por linfócitos TCD8+, bem como promove a maturação de DCs e a produção de citocinas inflamatórias (Hervas-Stubbs, *et al.*, 2007).

Assim como os BVs são capazes de ativar células do sistema imunológico, McLinden *et al.* (1992) observaram que OBs recombinantes que carregam epítomos da hemaglutinina A (HA) do vírus influenza, fusionada na porção N-terminal do gene *pol* de AcMNPV, induz a produção de anticorpos específicos contra HA. De forma semelhante, a fusão da proteína E do envelope do vírus da febre suína clássica (VFSC) com a POL foi capaz de estimular a resposta imunológica em modelo experimental, com maior imunogenicidade da proteína E do que do POL (Lee, *et al.*, 2012). Esses trabalhos demonstram a ação imunomoduladora de AcMNPV e um potencial modulador do sistema imune da forma poliedro.

Imunomoduladores

Imunomoduladores são substâncias que modificam a resposta imunológica em determinados contextos biológicos, seja estimulando a resposta imune inata e adaptativa à determinados microrganismos (vírus, bactérias e protozoários), células neoplásicas, ou induzindo atividade antinflamatória (Felipe, *et al.*, 2016). Os imunomoduladores podem ter diferentes origens, como os polissacarídeos, proteínas, proteínas recombinantes, substâncias sintéticas, vetores virais, produtos microbianos, ácidos nucleicos (Figura 6) (Blecha, *et al.*, 2001).

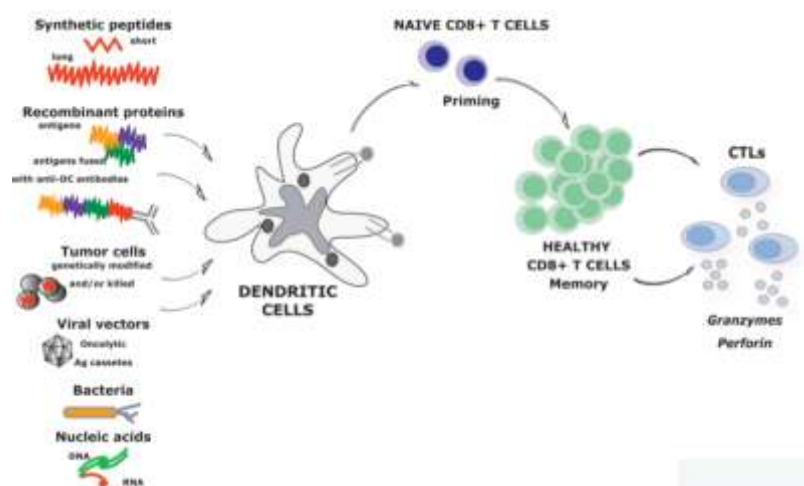


Figura 6. Os imunomoduladores são capazes de ativar células dendríticas e induzir a ativação de linfócitos TCD8+. Os imunomoduladores são desenvolvidos para estimular a imunidade celular. Nesse objetivo, espera-se que eles estimulem novas células T com a diferenciação em células efetoras e de memória (Modificado Palucka K e Banchereau J., 2013).

O desenvolvimento de imunomoduladores possibilita a sua utilização em diferentes contextos no cuidado a saúde, desde a prevenção como o desenvolvimento de preparações vacinais à terapias contra o câncer, doença autoimune, alergias. O perfil de resposta imune induzida pelos imunomoduladores têm sido extensivamente estudados tanto *in vivo* como *in vitro* (Bowdish, 2006). Atualmente já estão disponíveis no mercado ou ainda em fase clínica I, II ou III diferentes imunomoduladores aplicados na imunoterapia, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Tipos de Imunomoduladores e suas respectivas aplicações e fase clínica

Imunomoduladores	Aplicação	Fase Clínica
Monofosforil Lipídio A	Adjuvante	Fase Clínica IV
BCG (Bacilo Camette-Guérin)	Imunoterápico e Adjuvante	Fase Clínica IV
Glicopiranosil Lipídeo A	Adjuvante	
Amplicav	Adjuvante	Fase Clínica IV
Imiquimode	Imunoterápico	Fase Clínica III
Flagelina	Adjuvante	Fase Clínica I
Interleucina 2 (IL-2)	Imunoterápico	Fase Clínica III

Os imunomoduladores influenciam diretamente a ativação e função das células do sistema imune (Chi, *et al.*, 2012). Essas mudanças podem ser identificadas quando ocorre regulação positiva dos níveis de expressão dos complexos de histocompatibilidade principal I (MHC-I) e II (MHC-II) em células apresentadoras de antígenos (APC); aumento da expressão de moléculas coestimulatórias (CD40, CD80 e CD86) necessárias para ativação de linfócitos T naive; diferenciação de linfócitos T, ativação de linfócitos B com a produção de anticorpos (Figura 7) (Zaman, *et al.*, 2013).

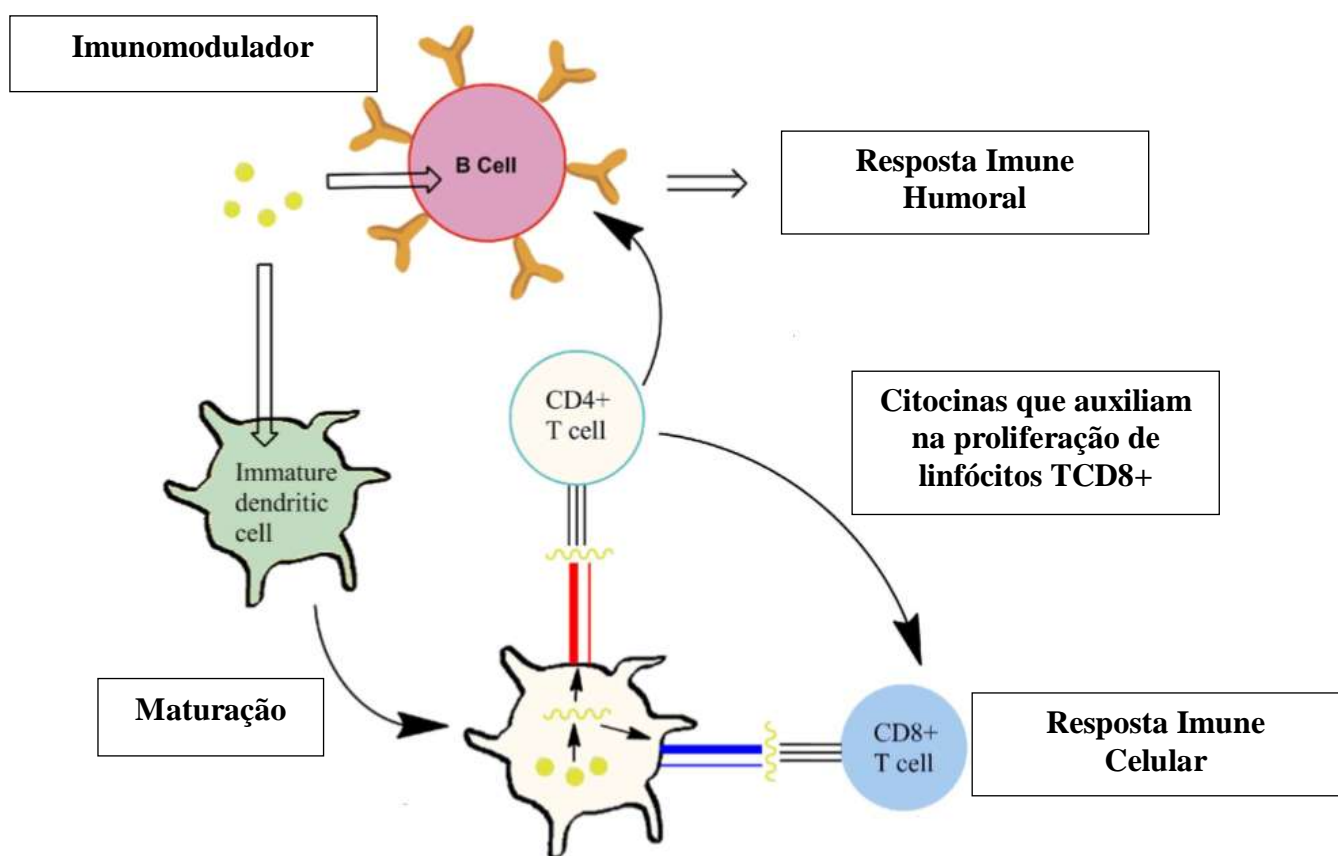


Figura 7. Indução de uma resposta imune induzida por um imunomodulador. O imunomodulador é reconhecido pela célula dendrítica, resultando na maturação da DC. Este processo de maturação envolve o aumento da expressão de MHC-II e moléculas coestimulatórias. Após a maturação das DCs ela se torna capaz de ativar subpopulações de células T que reconhecem o epítipo peptídico mediando então uma resposta imune celular ou humoral específica do antígeno (Modificado de Zaman, *et al.*, 2013).

Os imunomoduladores podem ser reconhecidos pelas células da resposta imune inata por meio dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), resultando na ativação ou supressão da resposta imunológica (Akira, *et al.*, 2006). Entre as diferentes moléculas com ação imunomoduladora, os agonistas dos receptores semelhantes ao toll (TLR), têm sido extensivamente estudados (Dowling, *et al.*, 2016). Além disso, a sinalização dos TLR também desempenha um papel na indução de células B e T. Em APCs, incluindo células B, DCs e MOs, a sinalização dos TLR também resulta em secreção de ambos os mediadores pró e anti-inflamatórios que favorecem o desenvolvimento dos diferentes perfis celulares, como por exemplo Th1, Th2, Th17 ou Treg (Kaisho, 2002).

Imunomoduladores e sua Interação com Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs)

Os imunomoduladores são reconhecidos pelos PRRs, localizados em células da resposta imune inata quanto adaptativa. Após o reconhecimento do ligante que pode ser um imunomodulador ao PRR inicia a sinalização de uma variedade de mecanismos de transdução de sinais, levando a produção de citocinas e aumento da expressão de moléculas coestimulatórias em células apresentadoras de antígenos em especial as células dendríticas (Barton GM., *et al.*, 2009; Goutagny, *et al.*, 2012).

Os TLRs são importantes no reconhecimento de imunomoduladores, dentre eles os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 estão localizados na superfície das células, enquanto TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 e o TLR10 são encontrados em compartimentos endossomais da célula (Van, *et al.*, 2006). A ativação do TLR é o primeiro passo para estimular células da resposta imune inata (Kawai, *et al.*, 2010). Assim, tem-se aumentado o estudo e desenvolvimento de agonistas de TLRs para diferentes finalidades como alvo de adjuvantes de vacinas (Baldrige, *et al.*, 2004), imunoterapias contra câncer (Schön, *et al.*, 2008) e terapias em doenças autoimunes (Marshak-Rothstein, 2006).

Atualmente é conhecido diferentes agonistas de TLR e seus respectivos receptores, como por exemplo: triacilipoproteína agonista de TLR1/TLR2; Monofosforil lipídeo A (MPLA) e Pam2Cys agonistas de TLR2/TLR6; MPLA agonista de TLR4; flagelina agonista de TLR5; imiquimode agonistas de TLR7/TLR8; CpG-ODN agonista de TLR9 (Figura 8).

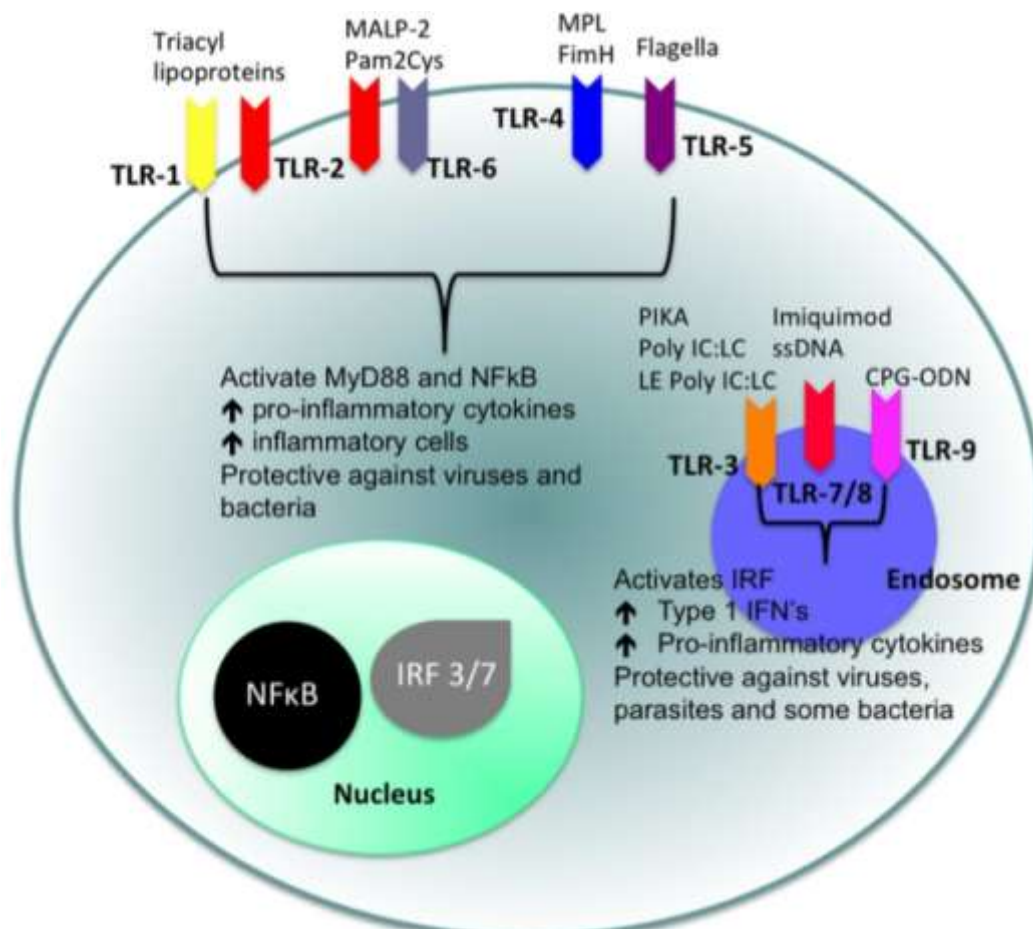


Figura 8. Localização celular de TLRs e a identidade de seus ligantes / agonistas. A estimulação de TLRs de superfície (TLR2, TLR4 e TLR5) com ligantes apropriados resulta na ativação de NFkB. Há aumento subsequente dos níveis de citocinas próinflamatórias com o desenvolvimento de uma resposta imune capaz de combater vírus e bactérias. A ativação dos TLR intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) leva à ativação da IRF e à produção de IFNs Tipo 1 e citocinas pró-inflamatórias (Modificado de Edin, et al., 2014).

A ativação das APC em especial das DCs, consiste primeiramente no reconhecimento de componentes do microrganismo, os denominados padrões moleculares associados ao patógenos (PAMPs) (Barton GM., et al., 2009) pelos PRRs, dentre eles o TLR (Kawai, *et al.*, 2011). A ativação do TLR é o primeiro passo para estimular células da resposta imune inata (Kawai, *et al.*, 2010). Como consequência, os TLRs são alvo para o desenvolvimento de vacinas (Baldrige, *et al.*, 2004), imunoterapias contra câncer (Schön, *et al.*, 2008) e tratamentos de doenças autoimunes (Marshak-Rothstein, 2006).

Sabendo da capacidade agonista de TLR em ativar o sistema imunológico, tem-se proposto por meio da tecnologia de DNA recombinante a produção de proteínas heterólogas fusioandas a um agonista de TLR. O exemplo mais bem sucedido é a Trumenba®, que é uma

vacina cujo adjuvante é um agonista de TLR2, contra o da grupo meningite meningocócica B (Luo, *et al.*, 2016). A flagelina bacteriana (um ligante TLR5) também foi intensamente estudada em ensaios clínicos na fusão com antígenos do vírus influenza (Taylor, *et al.*, 2011; Turley, *et al.*, 2011; Tussey, *et al.*, 2016). Outros exemplos testados em estudos pré-clínicos incluem o antígeno Ag473, um ligante TLR2 fusionado à proteína de envelope E3 do vírus da dengue (Chen, *et al.*, 2009) e também a proteína de choque térmico 70 (HSP70) fusionada à proteína p24 do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (Ampie, *et al.*, 2015).

A descoberta que o TLR3 reconhece o ácido ribonucleico de fita simples,, um dos principais componentes de muitos vírus, revelou um papel para os TLRs nas respostas antivirais (Alexopoulou, *et al.*, 2001). Evidências sugerem que muitos vírus ativam a imunidade inata através de TLRs, o que leva à imunidade protetora contra infecções virais. Os TLRs endossômicos (TLR3, 7, 8 e 9) reconhecem os ácidos nucleicos virais, enquanto alguns TLRs na membrana plasmática (TLR1, 2, 4 e 6) detectam proteínas virais (Carty & Bowie, 2010). Além disso, estudos mostram que assim como os vírus a forma BV do baculovírus é capaz de estimular a resposta imune inata podendo atuar como um potencial adjuvante na estimulação da resposta imune adaptativa contra os vírus em mamíferos (Abe, *et al.*, 2003, Abe, *et al.*, 2005).

Apesar de estudos demonstrarem que a forma BV dos baculovírus AcMNPV possuem capacidade imunomoduladora, conforme já descrito, ainda não sabe se o poliedro de AcMNPV que pode ser utilizado como estratégia de apresentação de proteínas heterólogas ou antígenos de interesse, capaz de ativar e/ou modular células da resposta imune inata e adaptativa. Sabendo da necessidade de desenvolvimento e estudo de novos imunoterápicos, o presente projeto buscou avaliar as propriedades imunológicas do poliedro de AcMNPV como potencial imunomodulador, podendo futuramente ser utilizado em diferentes aplicações terapêuticas.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade do poliedro, produzido pelo baculovírus AcMNPV, em modular a resposta imune induzida pelas BMDCs de camundongos, analisando o seu potencial papel de imunomodulador. Para atingir este objetivo, foram realizadas as seguintes metas:

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a citotoxicidade do poliedro em células de mamíferos;
- 2) Avaliar a cinética de estimulação das BMDC com diferentes concentrações de poliedro;
- 3) Avaliar a capacidade do poliedro em ativar BMDC pela produção de citocinas; expressão de moléculas coestimulatórias e indução de proliferação de células T totais;
- 4) Avaliar o papel dos receptores TLR2 e TLR4 na ativação das BMDC estimuladas com o poliedro;
- 5) Analisar a expressão de genes induzidos pelo poliedro, que são relacionados às infecções virais;
- 6) Avaliar a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a, bem como a proliferação de esplenócitos totais e dosagem de citocinas *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção do Poliedro

Os poliedros do AcMNPV utilizados nos ensaios *in vivo* e *in vitro* deste trabalho, foram produzidos de acordo com o sistema Bac-To-Bac. Este sistema é utilizado para a expressão de proteínas heterólogas em que o gene de interesse é fusionado ao promotor do gene da poliedrina. No presente trabalho foi utilizado o poliedro de baculovírus AcMNPV recombinante, expressando altas concentrações de poliedrina. A produção do poliedro foi realizada pelo Dr. Leonardo A. Silva do grupo do Prof. Dr. Bergmann M. Ribeiro do Laboratório de Virologia Molecular da Universidade de Brasília (figura 9).

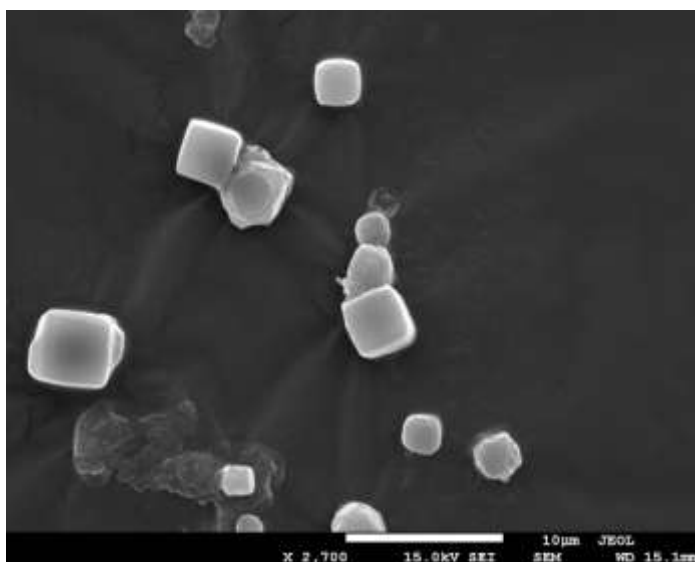


Figura 9. Microscopia eletrônica do poliedro de AcMNPV. O poliedro de AcMNPV foi produzido por meio do sistema de expressão de proteínas heterólogas Bac-To-Bac de acordo com Silva L.A, 2016, posteriormente foi identificado por meio de microscópio eletrônico (imagem disponibilizada pelo Dr.Silva).

3.2. Camundongos

Foram utilizados camundongos isogênicos C57Bl/6 para os ensaios *in vitro* e Balb/c para os ensaios *in vivo*, camundongos nocautes para o receptor do tipo Toll 2 (TLR-2) ou o receptor do tipo Toll 4 (TLR-4), de 8 a 10 semanas, de ambos os sexos. Os animais selvagens foram adquiridos do biotério Cemib/Unicamp. Os animais nocautes foram doados pela

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Todos os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Biologia, da Universidade de Brasília, com livre acesso à dieta padrão e água. Os procedimentos realizados estão de acordo com os procedimentos aceitos pelo Comitê de Ética no Uso de animal pela Universidade de Brasília (CEUA/UnB).

Para a eutanásia, os animais foram inicialmente anestesiados com quetamina e xilazina, e depois colocados em câmara de dióxido de carbono. A seguir, os órgãos, sangue e células foram obtidos conforme procedimentos previamente aprovados pelo Comitê de ética em Uso Animal da UnB (CEUA/UnB), sob o protocolo no 45/2017 (Anexo I).

3.3. Análises *in vitro*

3.3.1. Obtenção de Células Dendríticas e Macrófagos derivados de medula óssea

Células de medula óssea foram obtidas após lavagem do fêmur e da tíbia dos camundongos com meio RPMI-1640 para posterior diferenciação em BMDCs (Bone Marrow Dendritic Cells) e BMDM (Bone Marrow Derived Macrophage) segundo protocolo previamente descrito com modificações (Lutz et al., 1999) (figura 10). Em resumo, as células obtidas por lavagem, foram filtradas em membrana de 40 µm e centrifugadas (300 x g por 5 minutos) para posterior lise dos eritrócitos com uma solução tampão (0.16 M NH₄Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5). Um total de 2 x 10⁶ células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 suplementado com HEPES (25 mM), gentamicina (50 mg/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), 10% de soro fetal bovino (SFB), β-mercaptoetanol (20 ng/mL) e fator de crescimento granulócito-macrófago (GM-CSF) (20 ng/mL) e cultivadas em placas de Petri descartáveis por 8 dias, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. No terceiro e no sexto dia de cultivo, foram adicionados 10 mL do mesmo meio suplementado. No oitavo dia de cultivo, as diferentes populações celulares foram separadas para serem utilizadas nos experimentos. As células que não se apresentavam aderidas, ou se apresentavam fracamente aderidas na placa de Petri, foram consideradas BMDCs e as aderidas foram consideradas como BMDM.

Após a diferenciação, as BMDC e/ou BMDM foram cultivadas com diferentes estímulos como o lipopolissacarídeo (LPS) 500 ng/mL, o poliedro nas em diferentes concentrações descritas nas figuras e o Pam3 (300 ng/mL). Após 24 horas de cultura, os

sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12p70 e quimiocina CCL2 por meio de ensaios imunoenzimáticos, segundo protocolos dos fabricantes.

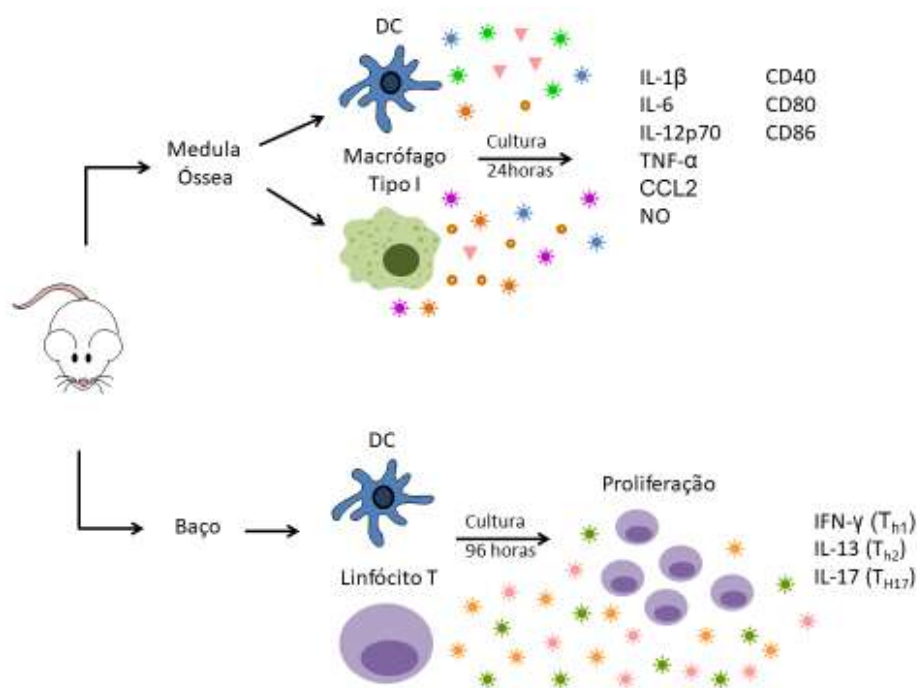


Figura 10. Figura esquemática demonstrando os experimentos *in vitro* com BMDC e BMDM e cocultura de BMDC e linfócitos. Os experimentos com BMDC e BMDM foram realizados no período de 24, enquanto a cocultura de BMDC e linfócitos extraídos do baço de camundongos foi de 96 horas. Em ambos experimentos foram coletados sobrenadante das culturas para a dosagem de diferentes citocinas. Na cocultura foi avaliada a proliferação de linfócitos marcados com CFSE.

3.3.2. Ensaio de Viabilidade Celular

A avaliação da citotoxicidade do poliedro em células de mamíferos foi realizada por meio da dosagem de lactato desidrogenase (LDH). Resumidamente, as células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) e macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), obtidos após a diferenciação de células da medula óssea, foram cultivadas em meio RPMI a 10% SFB com 0,2% de bicarbonato de sódio e 25 mg/mL de gentamicina em placa de 96 poços. As BMDCs ou BMDM foram incubadas com diferentes concentrações do poliedro (100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL e 6,25 μ g/mL), assim como com DMSO (500 ng/mL) ou apenas meio de cultura. As células foram cultivadas por 24 horas a 37°C, 5% CO₂.

Após a coleta do sobrenadante, foi realizada a dosagem de LDH, utilizando o kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, ref. G1780), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras foram analisadas por espectrofotometria, em comprimento de onda de 490 nm.

3.3.3. Marcação de Moléculas Coestimulatórias em Células Dendríticas Após o Estímulo com Poliedro

Para avaliar a ativação e maturação de BMDCs estimuladas com poliedro, foi realizada a análise de expressão das moléculas coestimulatórias na superfície das DCs (CD80, CD86), o complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II), e o receptor CD40, por meio de citometria de fluxo. As BMDC foram cultivadas na concentração de 3×10^6 células por poço em uma placa de seis poços em meio RPMI contendo 10% soro fetal. As células foram estimuladas com LPS e poliedro (12,5 µg/mL) por 24 horas, a 37°C, 5% CO₂. Após este período, as células foram desadheridas, lavadas com PBS (phosphate buffered saline) (300 x g, 5 minutos, 4°C), e marcadas com os anticorpos anti-CD11c (APC, eBioscience), isotipo controle IgG1 (APC, Ebioscience), anti-CD80 (FITC, eBioscience), anti-CD86 (FITC, eBioscience) e anti-MHC-II (FITC, eBioscience) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as células marcadas foram lavadas três vezes com PBS contendo 2% de soro fetal bovino e ressuspensas no mesmo tampão de lavagem para análise. Em seguida, um total de 50.000 eventos de cada amostra, foram adquiridos no citômetro de fluxo, FACS Verse BD. A estratégia para a seleção da população celular de interesse foi: (1) populações de células selecionadas de acordo com tamanho e granulosidade para o tipo celular (BMDC) (SSC-A vs FSC-A), (2) exclusão os doublets (células agrupadas) (FSC-A vs FSC-W) e (3) seleção de células positivas para o marcador de identificação.

3.3.4. Internalização dos Poliedros pelas Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea

Após a diferenciação, as BMDCs foram estimuladas com o Poliedro (12,5 µg/mL) em placas de 96 poços, em um volume de 200 µL de meio RPMI-1640 com 10% de SFB e cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 96 horas de estímulo, os poços foram lavados com o meio de cultura e corados com o kit panótico rápido (LB laborclin ref. 620529). Posteriormente, as BMDCs que internalizaram o poliedro, foram visualizadas no microscópio

óptico de luz.

3.3.5. Ensaio de PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) em Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea Estimuladas com Poliedro

As BMDCs foram cultivadas (3×10^6 células/poço em placa de seis poços) em meio RPMI com LPS (500 ng/mL), Pam3CSK2 (300mg/mL) e poliedro (12,5 µg/mL) a 37°C, 5% CO₂, por seis horas. Posteriormente, o RNA das células estimuladas foi extraído utilizando Trizol (Invitrogen, ref. 15596-026), conforme protocolo previamente estabelecido (Invitrogen, 2016). O RNA foi quantificado e armazenado a -80 °C. A concentração e a pureza do RNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000, ThermoScientific), em absorbância de 260 nm. As unicatas das amostras de RNA foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) para avaliar integridade e qualidade do RNA (figura suplementar S4).

A síntese de cDNA foi feita a partir de 1µg de RNA total de cada amostra, utilizando o kit RT2 First Strand Kit (Qiagen, ref. 330404), conforme instruções do fabricante. Para a PCR em tempo real, o kit FastSyber® Green Master Mix (Applied Biosystems, A25776) foi utilizado, observando as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 1/10 da reação de cDNA foi adicionada à reação de amplificação de PCR em tempo real, em um volume final de 10 µL (5 µL de SyBr® greenmastermix) (AppliedBiosystem), 3,6 µL de cDNA, 2 µL de água deionizada e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo específico (forward e reverse) dos genes: *IFN-α*, *TLR3*, *TLR9*, *NFκβ*, *IRF-3* (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências de Oligonucleotídeos utilizados para a RT-qPCR

Gene	Primer forward (5'→3')	Primer reverse (5'→3')
<i>IFN-α</i>	TTGACCTTTGCTTTACTGGT	CACAAG GGCTGTATTTCTTC
<i>TLR3</i>	GTGGATAGCTCCCTTCACCA	CAGAGCCGTGCTAAGTTGTTA
<i>TLR9</i>	CTACGCTTGTGTCTGGAGG	GCCAGCACAAATAGAGTCTTG
<i>NFκβ</i>	AGCCAGCTTCCGTGTTTGTT	AGGGTTTCGGTTCAGTATTCC
<i>IRF-3</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	GGATGCAGGGATGATGTTCT
<i>Rps9</i>	CGCCAGAAGCTGGGTTTGT	CGAGACGCGACTTCTCGAA

Todos os oligonucleotídeos, foram validados previamente. Como controle interno, foram utilizados os oligonucleotídeos que amplificam o RNA mensageiro da proteína

ribossomal 40S (gene Rps9). As condições de ciclagem da RT-qPCR estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Condições de ciclagem da RT-qPCR.

Ciclagem	Curva de Dissociação
1 – 50°C por 2 minutos	1 – 95°C por 15 minutos
2 – 95°C por 5 minutos	2 – 60°C por 1 hora
3 – 95°C por 3 segundos	3 – 95°C por 15 minutos
4 – 60°C por 30 segundos	

Para as análises de PCR em tempo real foi utilizado o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os níveis de expressão de transcritos foram avaliados e calculados utilizando os valores de Δct das amostras e os dados foram comparados usando o método de Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta ct}$) (Livak e Schmittgen, 2001). Os resultados foram representados utilizando o valor de expressão relativa ao controle (FoldChange), onde os controles e a significância de expressão gênica foi considerada quando maior que 2.

3.3.6. Obtenção de Linfócitos T a Partir da cultura de Esplenócitos Totais

Baço de camundongos isogênicos C57BL/6 selvagens, foram utilizados para a obtenção de esplenócitos totais para posterior enriquecimento de linfócitos T *in vitro*. Resumidamente, os baços foram divididos em meio RPMI-1640 e as suspensões celulares foram passadas através de peneira (cells trainer) de 70 μ m para posterior lavagem por centrifugação (300 x g por 5 minutos). O sedimento celular foi ressuspensão em tampão de lise de eritrócitos (0.16 M NH_4Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) e novamente lavado para posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO_2 em placa de petri, com volume final de 6 mL de RPMI. Após duas horas de incubação, as células não aderentes (população de células enriquecidas com linfócitos T), foram coletadas, ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado (1% de aminoácidos não essenciais; 1% de piruvato de sódio a 100 mM; 10% de Soro Fetal Bovino (SFB); 2 mM de L-glutamina; 50 μ M de 2 β -mercaptoetanol; 50 mg/L de gentamicina) e contadas em hemocitômetro. Para a cocultura, os linfócitos foram marcados

com Carboxifluoresceínasuccinimidil éster (CFSE) e adicionados à cultura.

3.3.7. Marcação de Linfócitos T ou Esplenócitos com CFSE

A cultura de linfócitos foi coletada e ressuspensa em 1 mL de PBS com CFSE (10 μ M). Agitou-se por sete minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, para parar a marcação, adicionou-se igual volume de SBF puro gelado e completou-se o volume do tubo com meio suplementado gelado e incubou-se por 5 minutos em temperatura de 4 °C. Posteriormente, as células foram lavadas com RPMI suplementado e a contagem das células marcadas foi realizada em hemocítmetro. Após a obtenção da concentração de linfócitos marcados com CFSE, estes foram adicionados à placa de 96 poços, para as culturas de proliferação celular.

3.3.8. Cocultura de Linfócitos com Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea

Na cocultura de linfócitos T e BMDCs, os linfócitos foram adicionados à cultura, na proporção de 10 linfócitos ($5 \cdot 10^5$) para 1 BMDC ($5 \cdot 10^4$) em uma placa de 96 poços. Para cada triplicata, foram adicionados RPMI suplementado (controle negativo) e poliedro (12,5 μ g/mL). Como controle positivo da proliferação celular, os linfócitos foram incubados com Concanavalina (4 μ g/mL). As culturas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 96 horas. Após incubação, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas (Figura 10) por ensaio imunoenzimático de acordo com as recomendações do fabricante.

Os linfócitos, das culturas, foram retirados do poço, com 400 μ L de PBS e marcados com um painel de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, sendo o anti-CD3 com a Alofocianina (APC), anti-CD4 com FITC, anti-CD8 com FITC. Todos os anticorpos foram previamente titulados e utilizados nas seguintes combinações: anti-CD3 e anti-CD4; anti-CD3 e anti-CD8. Os anticorpos foram diluídos em tampão de lavagem FACS (PBS contendo 2% SFB). As células foram incubadas por 30 min no escuro a 4° C. Após incubação, as células foram coletadas, lavadas e ressuspensas em 300 μ L de solução FACS. Em seguida, um total de 50.000 eventos de cada amostra, foram adquiridos no citômetro de fluxo, FACS Verse BD.

3.3.9. Avaliação da Produção de Citocinas e Quimiocina por Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay - ELISA)

As dosagens das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL- 12p70, IFN- γ , IL-17A, IL-13 e quimiocina CCL2 foram realizadas por meio da técnica ELISA tipo sanduíche, de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes (BD Biosciences, EUA; eBiosciences, San Diego, EUA). As leituras das densidades ópticas foram feitas a 450 nm no leitor de ELISA. Os resultados foram obtidos após a determinação da curva padrão calculada a partir das leituras de diferentes concentrações de citocinas, fornecidas pelos Kits comerciais.

3.4. Análises in vivo

3.4.1. Imunização dos Camundongos

Para o ensaio de imunização, foram utilizados 10 camundongos Balb/c. A via de administração foi a subcutânea, segundo protocolo da Fiocruz (Fiocruz, 2008) (figura 11). Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos, cada grupo com cinco camundongos. Em um dos grupos os camundongos foram imunizados com o poliedro na concentração de 50 μ g/dose (50 μ L) em um volume final de 500 μ L de PBS. No outro grupo os camundongos receberam 500 μ L de PBS. O esquema de imunização, foi de três doses com intervalo de 15 dias, conforme mostrado na Figura 11. Após 15 dias à ultima imunização os camundongos foram eutanasiados.

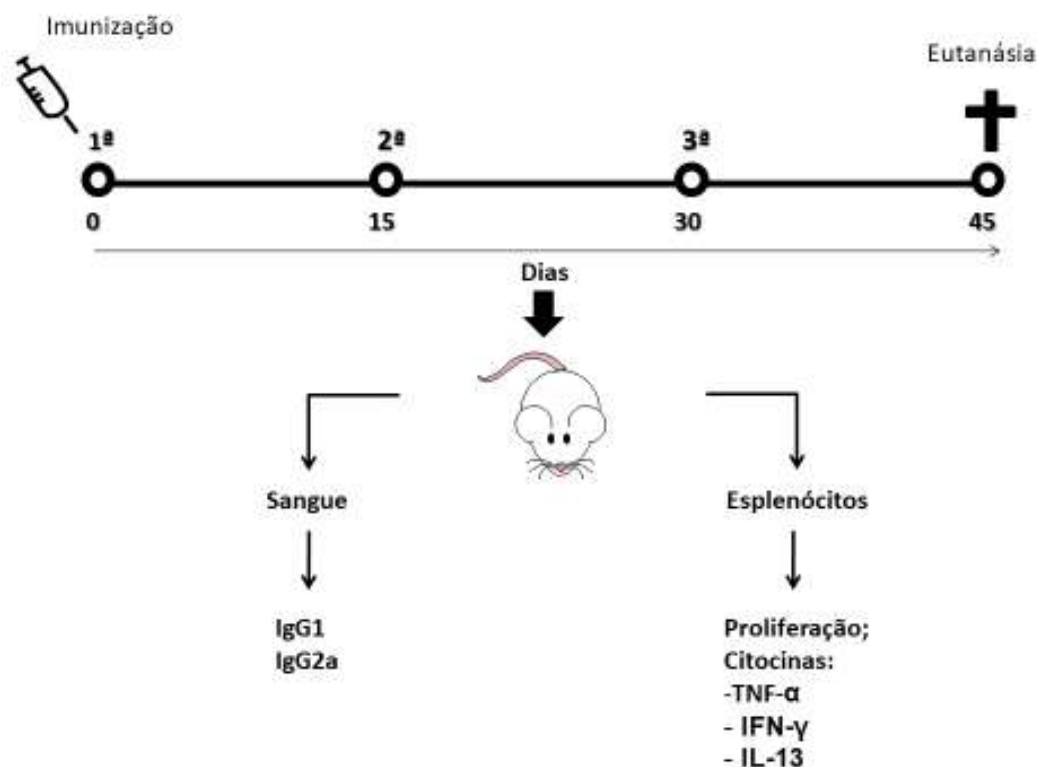


Figura 11. Figura representa o esquema de imunização de camundongos Balb/c inoculados com uma suspensão de poliedro ou veículo apenas. A imunização foi repetida a cada 15 dias, por 3 vezes. Após 15 dias, posterior a última imunização, realizou-se a eutanásia. Coletou-se o sangue e os baços dos camundongos para os experimentos *in vitro* para avaliação da proliferação dos esplenócitos e dosagem de citocinas.

3.4.2. Avaliação da Proliferação de Esplenócitos *ex - vivo*

Após a eutanásia dos camundongos Balb/, os baços, foram retirados para a obtenção dos esplenócitos. Para isso, os baços foram divididos em meio RPMI e as suspensões celulares e passadas através de peneira (cells trainer) de 70 μ m para posterior lavagem por centrifugação (300 x g por 5 minutos). O sedimento celular foi ressuspenso em tampão de lise de eritrócitos (0.16 M NH_4Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) e novamente lavado com meio RPMI. Após a obtenção dos esplenócitos, foi realizada a contagem utilizando o hemocítmetro. Os esplenócitos foram marcados com CFSE conforme descrito no item 3.3.8, e adicionados em placa de cultura de 96 poços. Cada poço possuía 1×10^5 esplenócitos no volume final de 200 μ L de meio RPMI suplementado.

Os esplenócitos foram estimulados com Concanavalina (4 μ g/mL), LPS (500 ng/mL),

poliedro (12,5 µg/mL) ou sem estímulo. As culturas, foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 96 horas. Após incubação, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de citocinas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Os esplenócitos marcados com CFSE coletados, lavados e ressuspensos em 300 µL de solução FACS. Posteriormente, um total de 50.000 eventos de cada amostra foram adquiridos no citômetro de fluxo, FACS Verse BD.

3.4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para Dosagem de IgG1 e IgG2a

O método de ELISA sanduíche foi utilizado para a detecção de IgG1 e IgG2a em amostras de soro de camundongos imunizados com poliedro ou não, seguindo as recomendações do fabricante (Sigma-Aldrick). As amostras foram diluídas 100 vezes para a dosagem das imunoglobulinas. Os resultados, foram expressos em ng/mL de anticorpos comparando se as OD com uma curva padrão.

3.5. Análise estatística

Para a análise dos resultados da citometria de fluxo, foi utilizado o programa FlowJo Versão 8. A tabulação dos resultados e construção dos gráficos foram feitas utilizando o programa GraphPadPrism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As comparações entre os respectivos grupos controles e nocautes para cada receptor, foram realizadas utilizando o teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) quando a distribuição das amostras foi normal de acordo teste paramétrico de Shapiro Wilk. Quando a distribuição não era normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann–Whitney, equivalente ao teste *t* ou teste de Kruskal Wallis. Os resultados foram considerados significativos adotando um nível de significância de 95%, onde os valores significativos, foram considerados como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito Citotóxico dos Poliedros nas BMDC

Antes de iniciar os experimentos, a atividade citotóxica do poliedro foi avaliada utilizando a detecção de LDH. O LDH é uma enzima localizada no citosol das células, cuja detecção no fluido extracelular indica morte ou perda da integridade celular (Lucisano e Mantovani, 1984; revisado de Monteiro, 2015). Neste teste, foram utilizadas as concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL, em culturas de BMDC e BMDM. A concentração de 200 µg/mL ela não foi utilizada por interferir na aderência das células. De acordo com resultado (Figura 12), observa-se que a porcentagem de BMDC viáveis não apresentou diferença estatística com o controle negativo (BMDC sem estímulo). Este mesmo resultado foi observado quando o poliedro foi incubado com macrófagos derivados da medula óssea (BMBD) (figura suplementar S1).

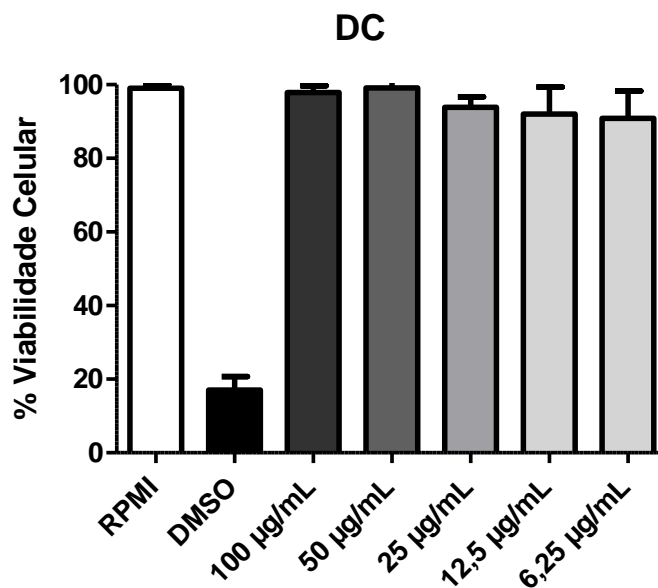


Figura 12. Avaliação da viabilidade de BMDC estimuladas com poliedro. As BMDC foram estimuladas com poliedro nas concentrações: 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL por um período de 24 horas. O sobrenadante foi analisado pela presença de LDH. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA análise de variância $p < 0.05$.

4.2. Estimulação dos Macrófagos Derivados de Medula Óssea (BMDM) pelo Poliedro

Para determinar a melhor concentração do poliedro a ser utilizado, padronizou-se a sua concentração, que foi utilizada nos experimentos desta tese utilizando macrófagos primários (Figura S2). Nesta padronização foi avaliado a produção de TNF- α por macrófagos estimulados com diferentes concentrações do poliedro (100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$) em cultura de 24 horas. A concentração escolhida foi a de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, que foi a penúltima menor concentração que induziu níveis elevados de TNF- α .

A partir da determinação da concentração do poliedro, analisou-se se as células DCs seriam capazes de produzir TNF- α em resposta à estimulação com do poliedro durante 6, 24 e 48 horas (figura 13). O aumento de TNF- α foi observado a partir de 6h de estímulo com o poliedro, com produção máxima em 48h.

4.3. Internalização do Poliedro pelas Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea (BMDC)

Inicialmente, a ativação das DCs é dependente do reconhecimento e/ou internalização de moléculas imunomoduladoras. Considerando que o poliedro é capaz de ativar as DC, conforme observado na figura 3 13, o próximo passo foi avaliar se essa ativação é dependente de contato e/ou internalização do poliedro e se há modificações morfológicas nas DCs.

Para analisar a interação do poliedro com as DCs, estas foram incubadas com a poliedro na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ por 96 horas. Pela análise da microscopia óptica, verificou-se que as DCs são capazes de internalizar o poliedro e que é capaz de se manter no citoplasma, com ausência de alterações morfológicas por até 48 horas (Figura 14).

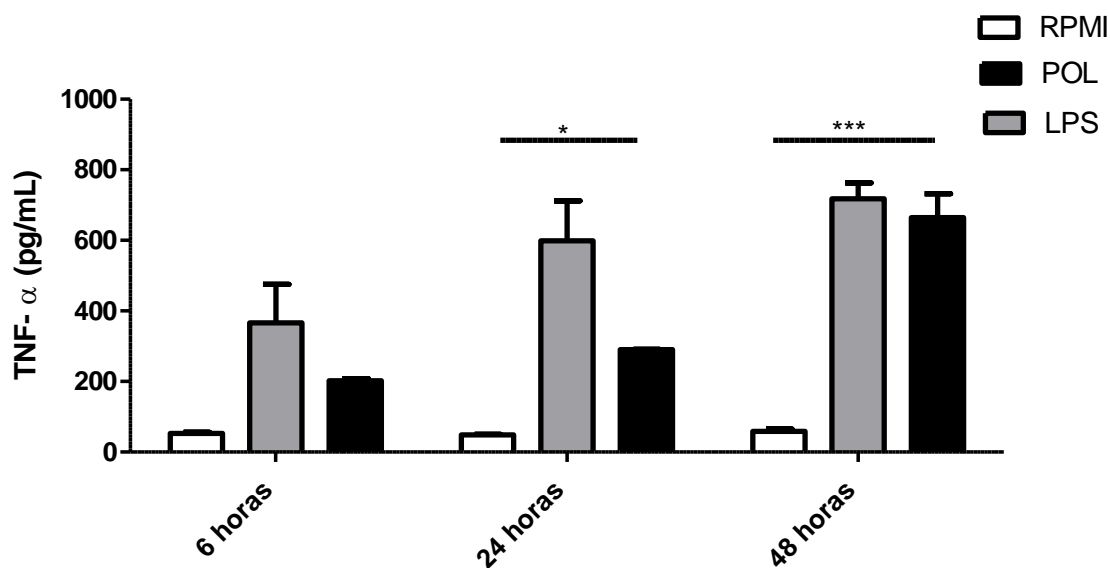


Figura 13. Avaliação da cinética de produção de TNF- α pelas BMDC estimuladas por poliedro. As BMDC estimuladas foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) ou poliedro (12,5 $\mu\text{g/mL}$), nos períodos de 6, 24 e 48, horas * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento representativo de outras duas repetições. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

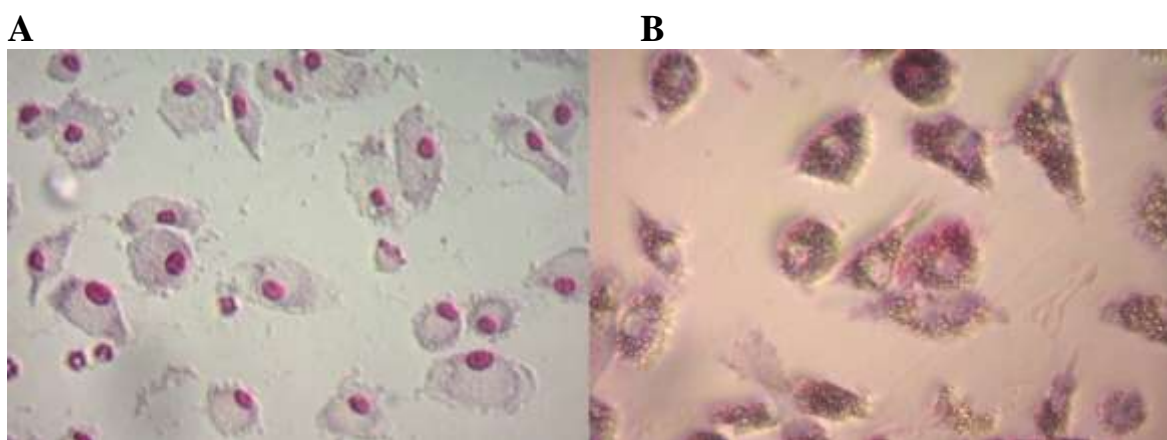


Figura 14. Internalização do poliedro pelas BMDC. (A) Fotomicrografia de BMDC em meio RPMI sem estímulo. (B) Fotomicrografia de BMDC incubadas com poliedro (12,5 $\mu\text{g/mL}$) por 96h. As imagens foram obtidas em microscópio de luz utilizando objetiva de 400X.

4.4. O Poliedro Induz a Alterações funcionais em BMDC

As funções das DCs estão diretamente relacionadas aos estímulos do microambiente. As principais respostas à esses estímulos externos são manifestadas sob alterações fenotípicas e funcionais (Merad, et al., 2013). Para avaliar a capacidade do poliedro em alterar os aspectos

funcionais de BMDC, como a produção de citocinas, o poliedro foi incubado com as BMDCs por 24h na presença de LPS ou poliedro ou sem estímulo. Observa-se que o poliedro induziu o aumento da produção de IL-1 β , IL-6 e IL-12. No entanto, não se observou a produção de CCL2, quimiocina importante para o recrutamento de monócitos para o local do processo inflamatório (figura 15).

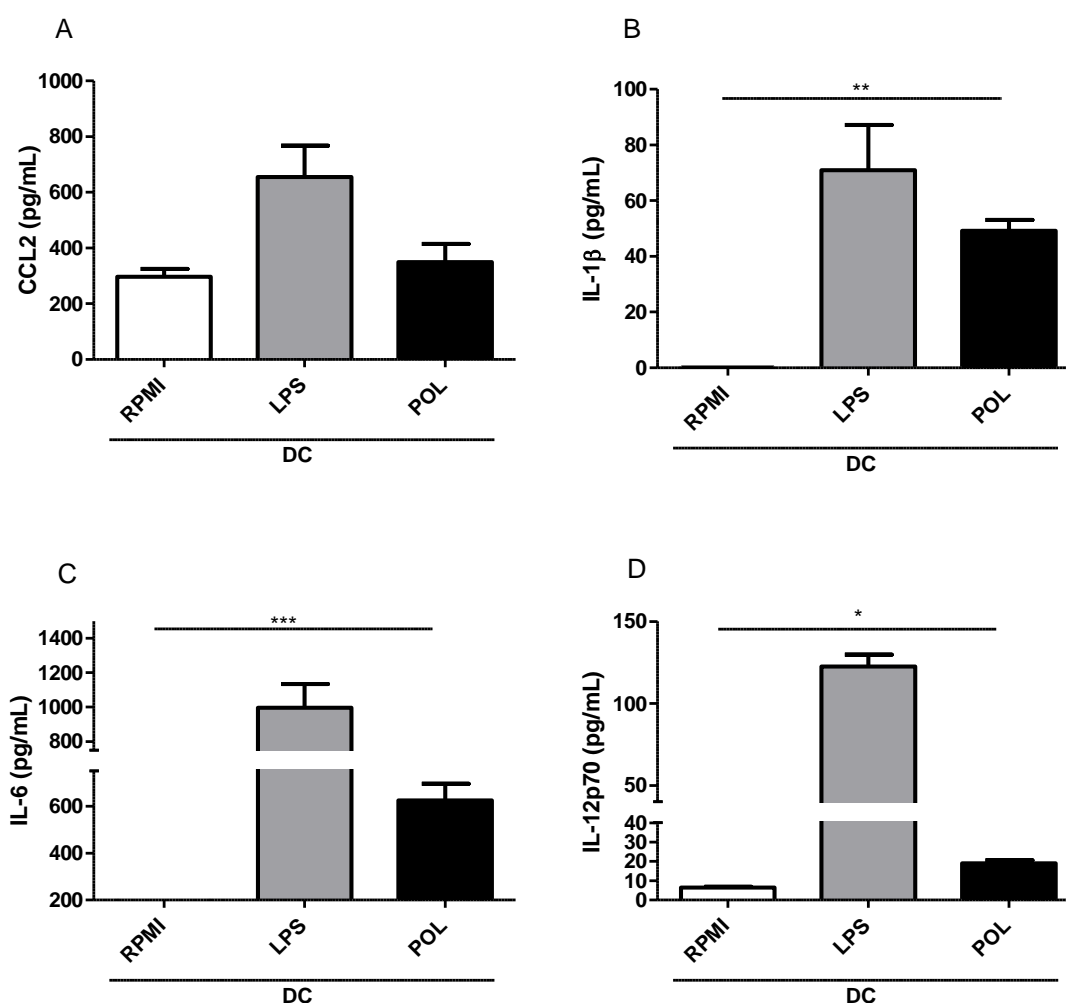


Figura 15. Avaliação da produção de CCL2 (A), IL-1beta (B), IL-6 (C) e IL-12p70 (D) pelas BMDC estimuladas com poliedro. As BMDC foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) e poliedros (12,5 μ g/mL) e os sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas e os níveis destas citocinas foram determinados por ELISA * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

O poliedro também foi capaz de modular alterações fenotípicas nas BMDCs, que podem contribuir com a ativação da resposta imune adaptativa. Essa transição depende da

diferenciação e maturação das BMDCs, que é observada pela expressão de moléculas coestimulatórias (CD80, CD86), MHC-II, e expressão de CD40, necessários para ativação de linfócitos T. Neste sentido, verificou-se se o poliedro era capaz de induzir o aumento da expressão das moléculas coestimulatórias (CD80, CD86), MHC-II, no entanto, não induziu aumento na expressão de CD40. Observou-se na figura 16 que o poliedro foi capaz de induzir o aumento da expressão de CD80, CD86 e MHC-II nas BMDCs comparado ao controle negativo, após 24 horas de cultura.

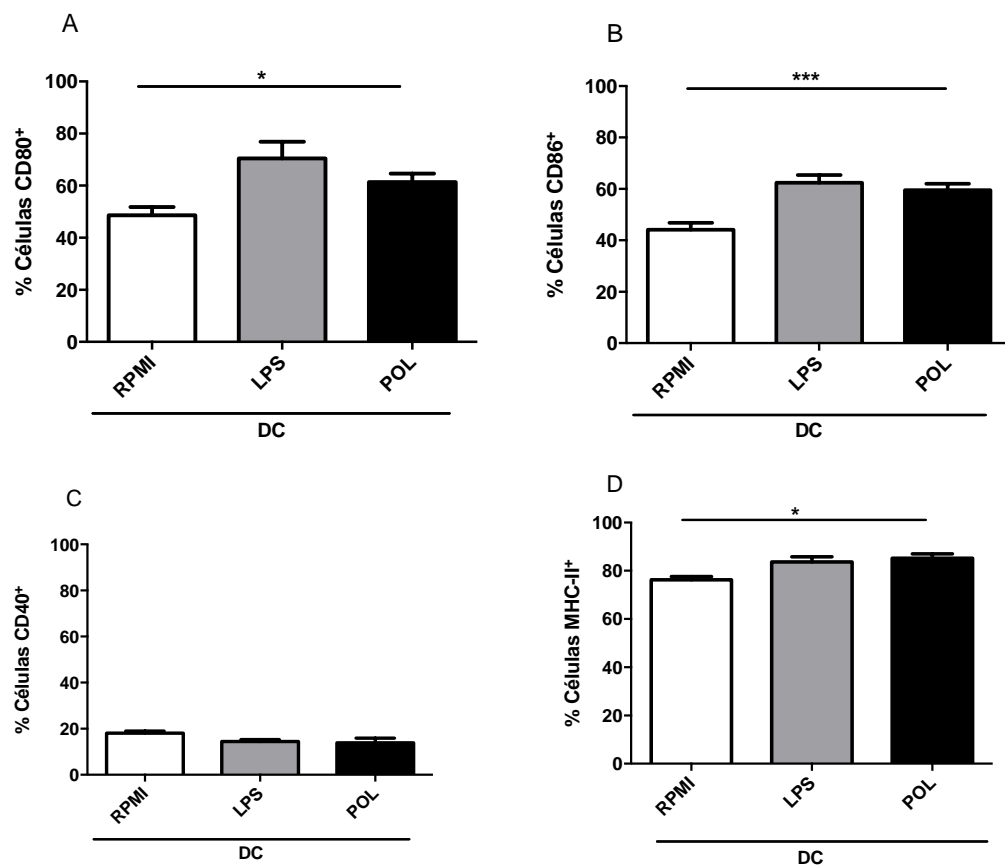


Figura 16. Avaliação da porcentagem de BMDC que expressam CD80 (A), CD86 (B), CD40 (C) e MHC-II (D) estimuladas com poliedro. As BMDC foram estimuladas com poliedro (12,5 µg/mL) e lipopolissacarídeo (LPS), após 24 horas de cultura com os estímulos. As BMDC foram marcadas com anticorpo anti-CD11c (APC), anticorpo anti-CD80 (FITC), anticorpo anti-CD86 (FITC), anticorpo anti-CD40 (PE) e anticorpo anti-MHC-II (FITC) * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

4.5. As Células Dendríticas Estimuladas com o Poliedro são Capazes de Induzir a Proliferação de Linfócitos T

De acordo com os resultados anteriormente demonstrados, as BMDCs, quando estimuladas com poliedro, foram capazes de induzir a produção de citocinas (Figura 15) e aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, MHC-II, CD80 e CD86 (Figura 16). A próxima etapa foi verificar se as DCs ativadas pelo poliedro tem a capacidade de induzir a proliferação de linfócitos e qual a subpopulação de linfócitos T está alterada. Como demonstrado nas figuras 17 e 18, o poliedro induziu a proliferação de linfócitos totais (figura 17), especificamente do subtipo CD4+ (figura 18), cujos gates das subpopulações podem ser visualizados na figura S3.

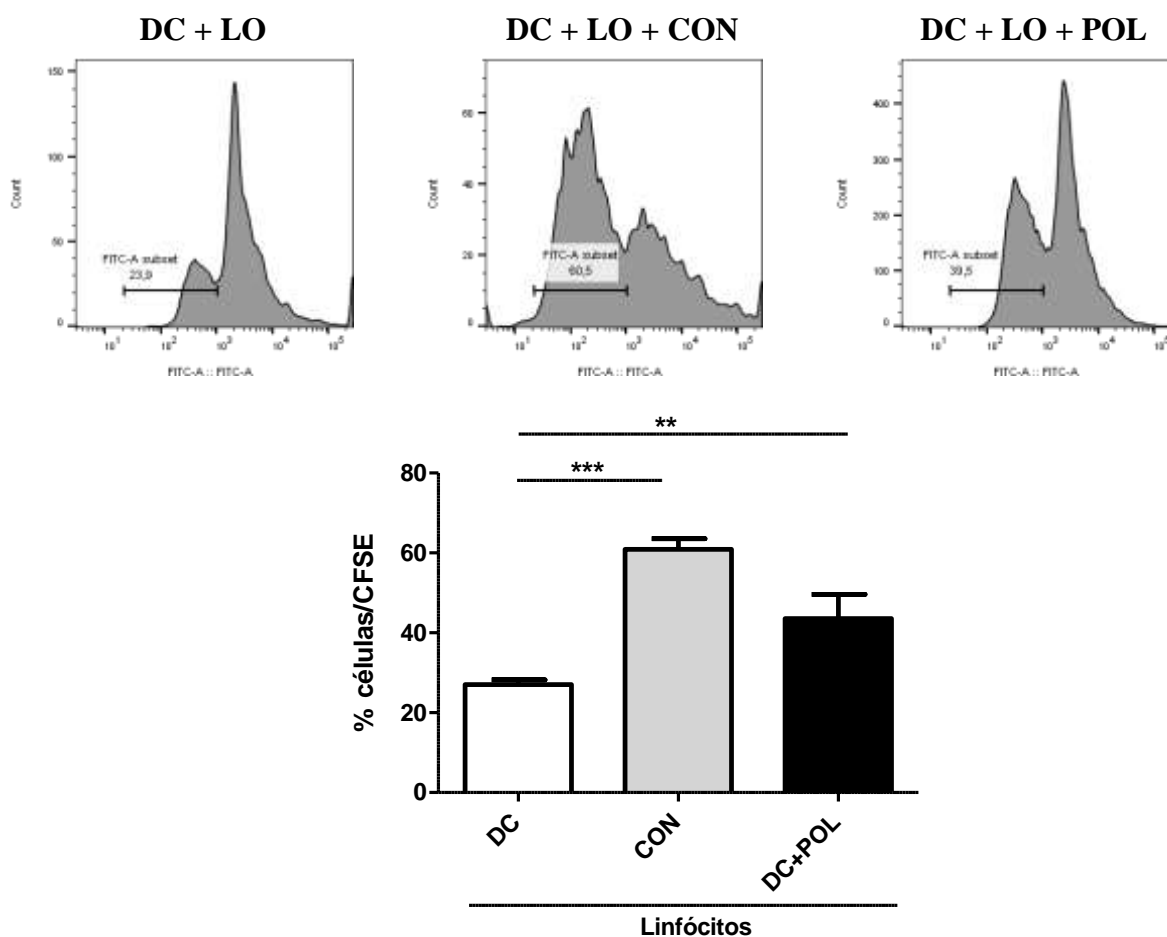


Figura 17. Proliferação de linfócitos T em cocultura com BMDC estimuladas com poliedro. Os linfócitos foram marcados com CFSE e colocados em cultura com BMDC estimuladas com poliedro. Controle positivo foram linfócitos estimulados concanavalina A, no período de 96 horas * $p \leq 0,05$ **

$p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

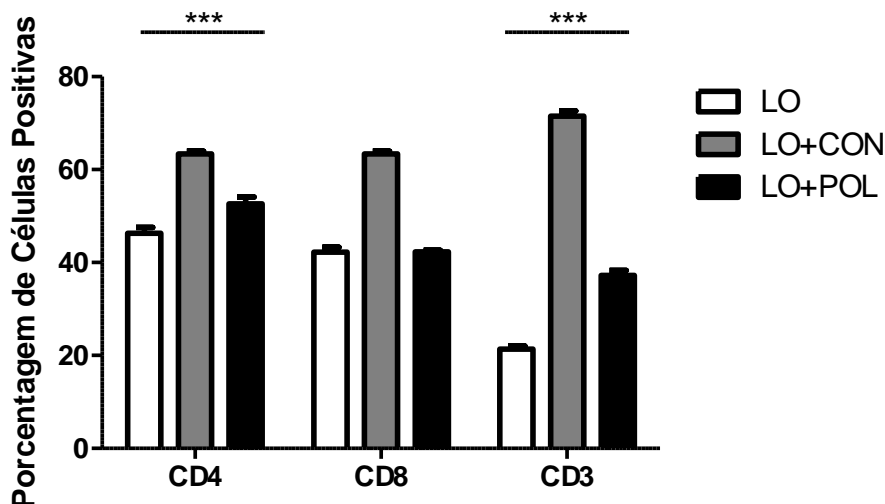


Figura 18. Porcentagem de células positivas marcadas com CD3+, CD4+ e CD8 em cultura com BMDC estimuladas com poliedro. Linfócitos T e BMDC foram adicionados em meio RPMI suplementado a 10% de soro fetal bovino para detecção da porcentagem de linfócitos marcados com CD3+, linfócitos CD4+ e linfócitos CD8+. Foi realizada a marcação dos linfócitos com anticorpo anti-CD3 (APC), anticorpo anti-CD4 (FITC) e anticorpo anti-CD8 (FITC); Controle positivo linfócitos estimulados concanavalina A na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$; DC estimuladas com poliedrina na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ no período de 96 horas * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

4.6. O Poliedro é Capaz de Induzir Aumento da Produção de IL-17 in vitro

A partir do resultado anterior, em que foi verificado que DCs estimuladas com poliedro são capazes de induzir a proliferação de linfócitos TCD4⁺, a próxima etapa foi verificar o perfil de resposta imune induzida pelo poliedro, mediante a dosagem de citocinas: IL-17 e IL-13 do sobrenadante de cocultura de DC e linfócitos T, após 96 horas de cultura. Observa-se que células dendríticas ativadas pelo poliedro, foram capazes de induzir a produção de IL-17 pelos linfócitos (Figura 19A), mas não a produção de IL-13 (Figura 19B).

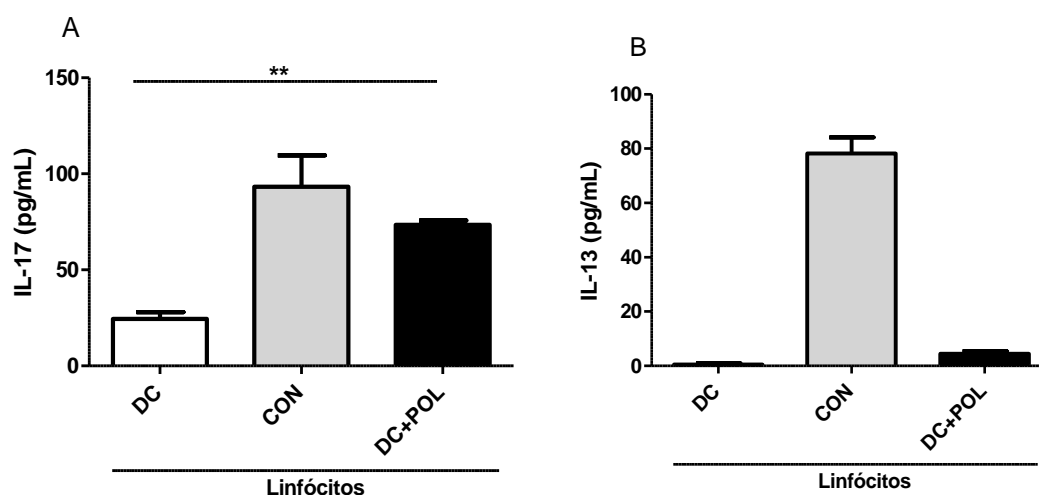


Figura 19. Avaliação da produção de IL-17 e IL-13 pelos linfócitos em cocultura com BMDC estimuladas com poliedro. Avaliação da produção de IL-17A (A) e IL-13 (B) solúveis por linfócitos T obtidos de células totais do baço de camundongos C57Bl/6 cocultivados com BMDC estimuladas com Concanavalina e poliedro na concentração de 2 µg/mL e 12,5 µg/mL respectivamente. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

1.1. Os receptores TLR2 e TLR4 são importantes na produção de citocinas inflamatórias em BMDCs estimuladas com o Poliedro

Sabendo que o poliedro pode apresentar ação imunomoduladora e conhecendo a importância dos TLRs na ativação das BMDC, avaliou-se se o poliedro poderia ser um agonista dos Receptor do tipo Toll 2 (TLR2) e Receptor do tipo Toll 4 (TLR4). Para responder essa pergunta, utilizamos BMDC proveniente de camundongos deficientes para o Receptor do tipo Toll 2 (TLR2 $-/-$) ou Toll 4 (TLR4 $-/-$), e avaliamos a produção de citocinas inflamatórias.

Observou-se que as BMDCs TLR2 $-/-$ ou BMDC TLR4 $-/-$, quando estimuladas com poliedro, apresentaram redução na produção de IL-6, IL-12p70 quando comparada as BMDCs de camundongo selvagens estimuladas com poliedro (Figura 20 A-B). Em relação a produção de CCL2, cuja produção não foi alterada com o estímulo dos poliedros, observamos que a ausência do TLR4 reduziu a sua produção (Figura 21), enquanto que a ausência do TLR2 não apresentou diferença estatisticamente significante com as BMDC diferenciados dos animais selvagens.

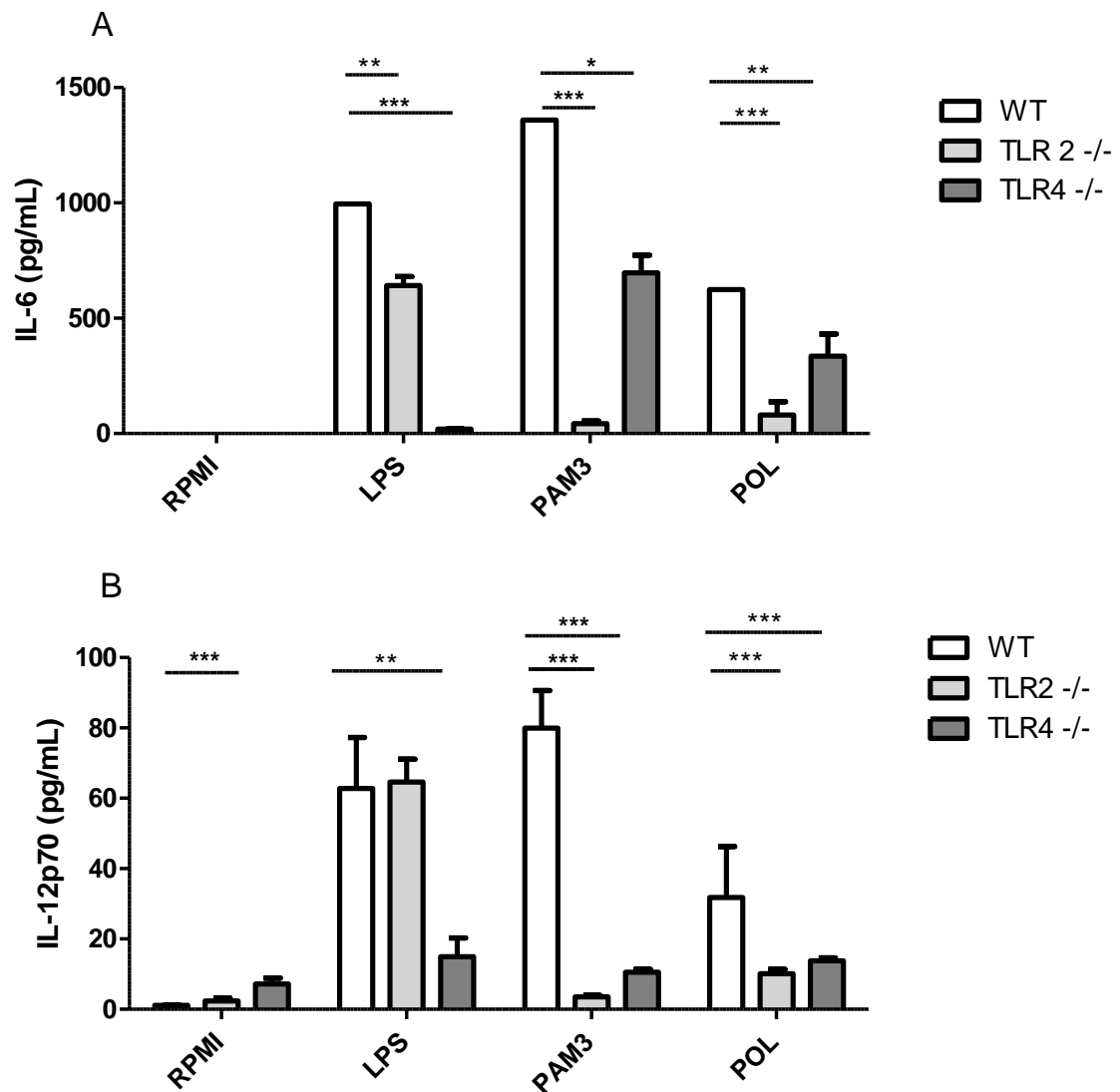


Figura 20. Avaliação da produção de IL-6 (A), IL-12p70 (B) por BMDC de camundongos selvagens (WT), camundongos nocautes para os receptores do tipo Toll 2 (TLR 2 -/-) e camundongos nocautes para os receptores do tipo Toll 4 (TLR 4 -/-), estimuladas com poliedro. As BMDC foram estimuladas com LPS (300 ng/mL), Pam3 (300 µg/mL) e o poliedro (12,5 µg/mL). * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

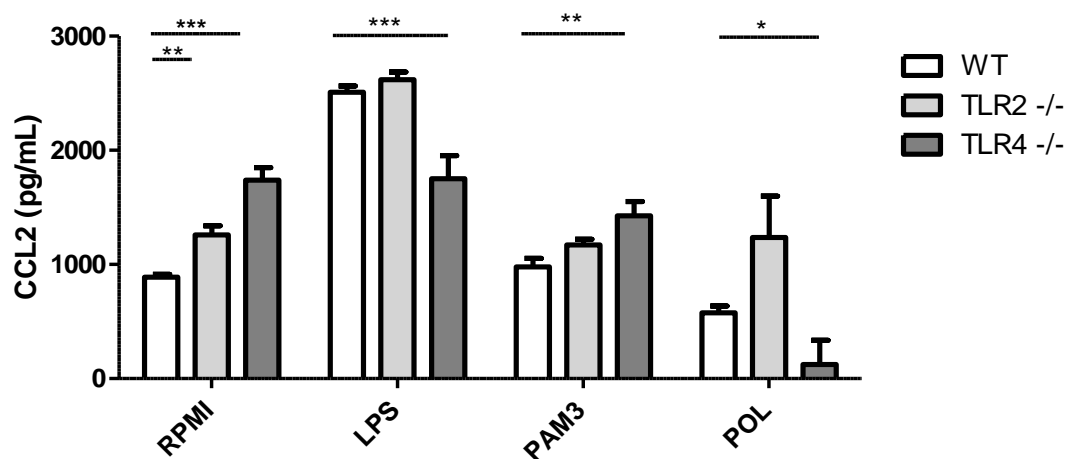


Figura 21. Avaliação da produção de CCL2 por BMDC de camundongos selvagens, nocautes para os receptores do tipo Toll 2 (TLR 2^{-/-}) e camundongos nocautes para os receptores do tipo Toll 4 (TLR 4^{-/-}), estimuladas com poliedro. As BMDC foram estimuladas com LPS (500ng/mL), Pam3 (300 ng/mL) e poliedro (12,5µg/mL). * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

4.7 Os receptores TLR2 e TLR4 interferem com a Proliferação dos Linfócitos T

A próxima etapa foi avaliar se as BMDCs deficientes de TLR2 ou TLR4, apresentariam alteração funcional em sua capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T. As DCs TLR2^{-/-} ou DCs TLR4^{-/-}, foram incubadas com o poliedro e depois cocultivada com os linfócitos T obtidos de camundongos selvagens. De acordo com a figura 22, observa-se que houve uma redução da proliferação de linfócitos T em cocultura com DCs TLR2^{-/-} ou DCs TLR4^{-/-}.

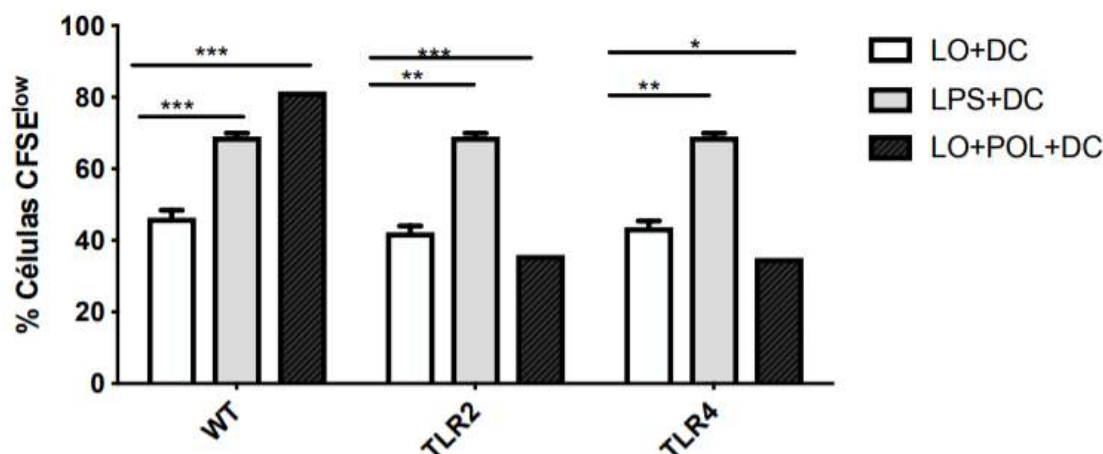


Figura 22. Proliferação de linfócitos T em cocultura com BMDC obtidas de camundongo selvagem WT, camundongos deficientes para os receptores do tipo Toll 2 (TLR2 $-/-$) e camundongos deficientes para os receptores do tipo Toll 4 (TLR4 $-/-$) estimuladas com poliedro. Os linfócitos T foram marcados com CFSE e colocados em cocultura com as BMDC estimuladas com Concanavalina A (4 μ g/mL) e poliedro (12,5 μ g/mL) no período de 96 horas * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

4.8 O Poliedro é Capaz de Induzir a Expressão dos Genes envolvidos na produção de IFN- α

Estudos têm identificado que o AcMNPV possui ação adjuvante, promovendo uma resposta imune celular e humoral com alta produção de interferons do tipo I (IFN) e citocinas inflamatórias (Abe, T., et al., 2003). Considerando a capacidade do baculovírus em induzir a produção de IFN e considerando a possível utilização do poliedro como imunomodulador, investigou-se se o poliedro induz a expressão de genes associados com a produção do interferon – α (IFN- α) e qual a via de transcrição é ativada.

Para avaliar a expressão dos genes associados a via de produção de IFN- α , as BMDCs de camundongos selvagens foram estimuladas com o poliedro, e avaliados a expressão dos genes IFN- α , NF κ B, IRF-3, TLR3 e TLR9.

De acordo com a figura 23 A, observa se que BMDCs estimuladas com poliedro induziu aumento da expressão de IFN- α , de forma semelhante quando estimuladas com LPS e Pam3. O poliedro aumentou a transcrição também do NF κ -B quando comparado com o grupo não estimulado, porém em níveis menores que o grupo estimulado com LPS e Pam3 (Figura 23 B). O gene IRF-3 teve maior expressão quando as BMDCs, foram estimuladas com o poliedro, porém em níveis menores que o grupo estimulado com Pam3 (figura 23 C). Em relação aos genes TLR-3 e TLR-9, o poliedro induziu uma forte transcrição destes genes

quando comparado aos outros grupos (figura 23 D-E).

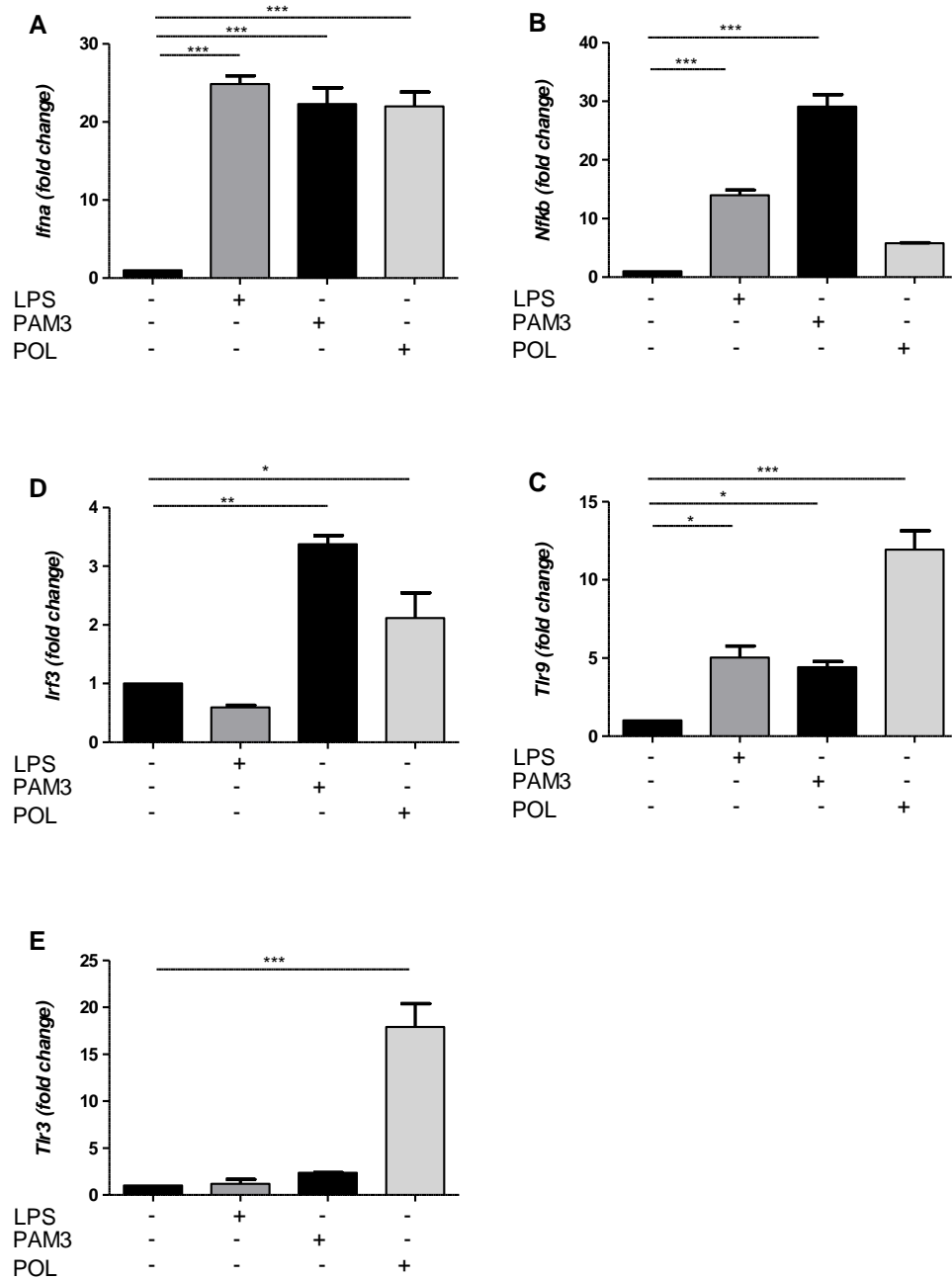


Figura 23. Expressão dos genes *IFN-α* (A), *NFκβ* (B), *IRF3* (C), *TLR9* (D) e *TLR3* (E) de BMDC estimuladas com poliedro. As BMDC foram estimuladas com LPS (1μg/mL), Pam3 (300 ng/mL) e poliedro (12,5 μg/mL), no período de 6 horas. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. Avaliação através da RT-PCR da expressão dos genes: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ *** $p \leq 0,0001$. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

4.9 A Imunização com o Poliedro Induziu um Aumento na Proliferação Celular, Produção Citocinas e de IgG2a *in vivo*

De acordo com os experimentos *in vitro*, avaliou-se o potencial deste imunomodulador na ativação da resposta imune celular e humoral *in vivo*. Camundongos Balb/c, foram imunizados com o poliedro ou somente o veículo, conforme descrito na figura 11. Após a imunização foi avaliada a proliferação *in vitro* de esplenócitos. Como demonstrado na figura 23, esplenócitos de camundongos imunizados com o poliedro e estimulados *in vitro* com o poliedro, apresentaram diferença estatística quando comparado aos esplenócitos do mesmo grupo de camundongos que não receberam estímulo *in vitro*, como também de esplenócitos de camundongos imunizados apenas com o veículo e estimulados *in vitro* com poliedro.

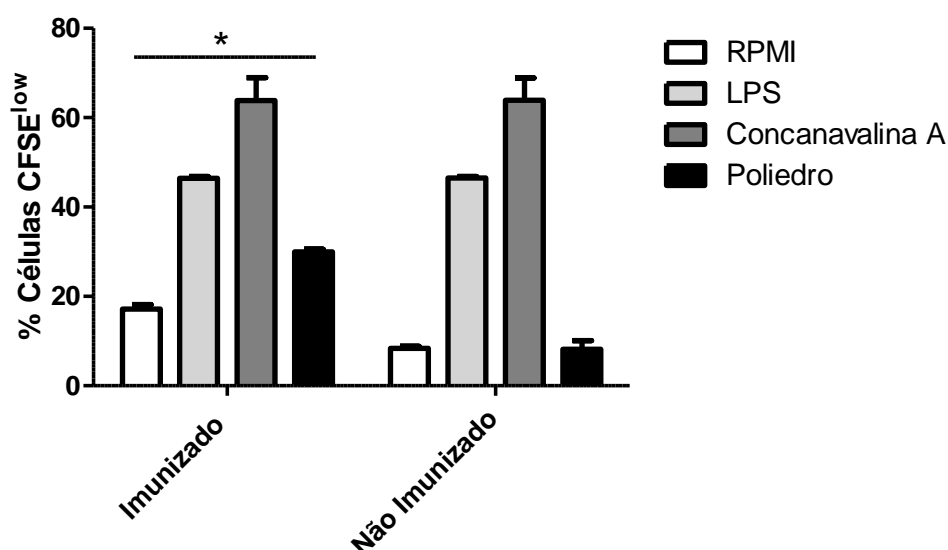


Figura 23. Avaliação da proliferação de esplenócitos de camundongos imunizados com o poliedro ou não e estimulados *in vitro* com poliedro. Os esplenócitos foram marcados com CFSE em cultura com meio RPMI suplementado a 10% de soro fetal bovino, posteriormente estimulados com concanavalina A (1µg/mL), LPS (500ng/mL) e poliedro (12,5µg/mL) e * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

Analizando o sobrenadante das culturas de esplenócitos de camundongos Balb/c imunizados com o veículo (Figura 25 A), observa-se que, embora há um aumento da produção de IFN- γ pelos esplenócitos estimulados *in vitro* com poliedro, a produção é muito baixa.

Enquanto não é observado a produção de IL-13 e TNF α . Enquanto, observa-se na figura 25 B que a produção de IFN- γ , pelos esplenócitos de camundongos imunizados com poliedro é alta quando comparado a cultura de esplenócitos sem estímulos *in vitro*. No entanto, não detectado a produção de IL-13 e TNF- α .

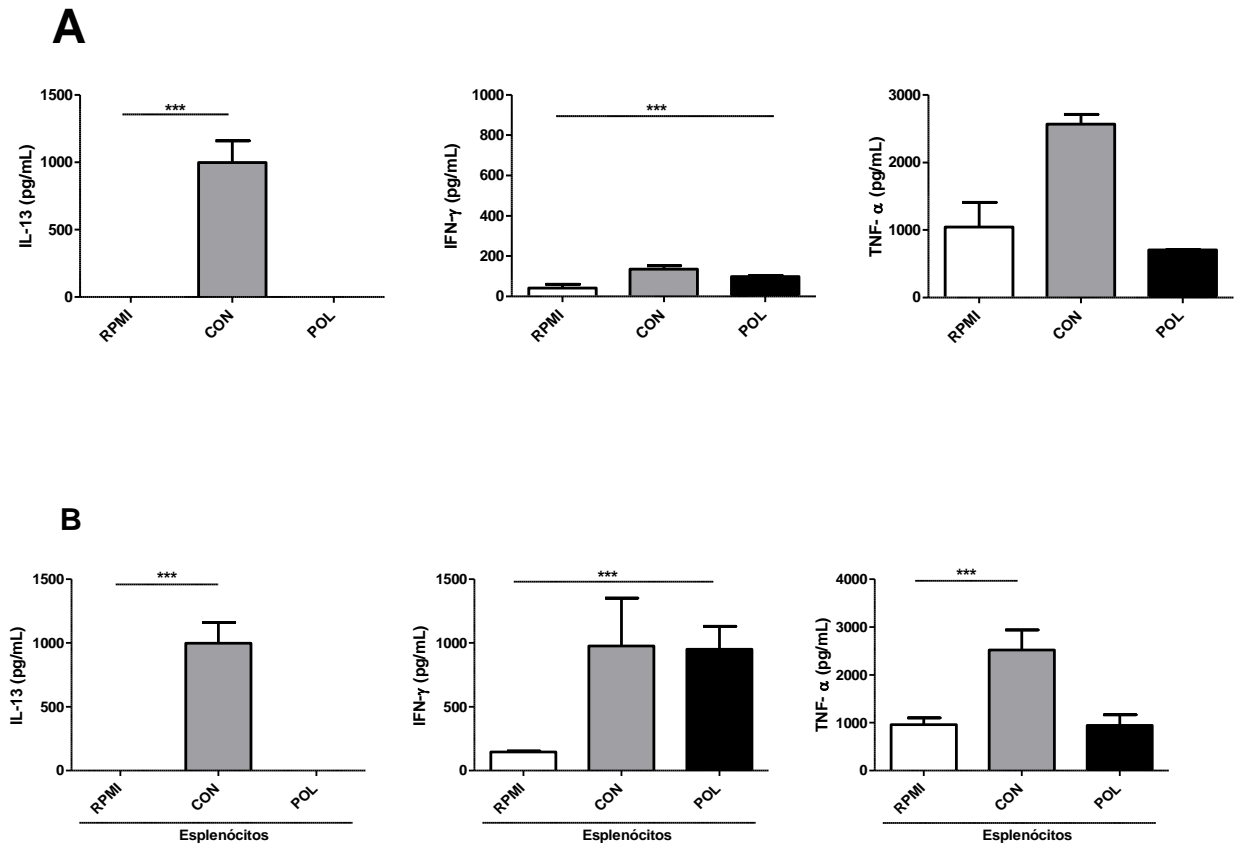


Figura 25. (A) Avaliação da produção de TNF- α , IFN- γ e IL-13 pelos esplenócitos de camundongos Balb/c não imunizados (B) e esplenócitos de camundongos Balb/c imunizados com poliedro. Os esplenócitos, foram adicionados em cultura com poliedro (12,5 μ g/mL), concanavalina A (1 μ g/mL) (controle positivo) ou ausência de estímulo. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

E finalmente para avaliar se o poliedro é capaz de induzir uma resposta imune humoral *in vivo* foi dosado, no soro de camundongos selvagens imunizados com poliedro a produção de IgG1 e IgG2a, relacionadas as respostas Th2 e Th1 respectivamente. Observa-se na Figura 26 que houve um aumento médio de 11,2 ng/mL e 21 ng/mL de IgG1 e IgG2a,

respectivamente, quando comparado ao grupo de animais não imunizados e imunizados com poliedro.

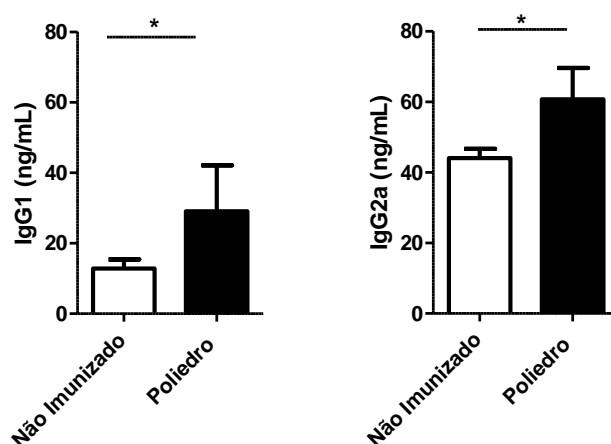


Figura 26. Análise da produção de IgG2a e IgG1 no soro de camundongos selvagens (WT) imunizados com poliedro e PBS. Soros de camundongos selvagens imunizados ou não com poliedro obtidos para dosagem de anticorpos. Após a obtenção do soro foi realizada a diluição 1/100. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA pós-teste: teste de múltiplas comparações Tukeys.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliado a função do poliedro de AcMNPV com potencial imunomodulador na resposta imune inata e adaptativa. Foi demonstrado que o poliedro é capaz de ativar uma importante célula da resposta imune inata, as DCs, induzindo a produção de citocinas inflamatórias. Além disso, observou-se o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e MHC-II, o que proporcionou a ativação dos linfócitos T com a produção de IL-17 e IFN- γ , bem como a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a.

Na busca de estratégias de apresentação de antígenos, para induzir respostas imunes humorais e/ou celulares, os baculovírus têm se mostrado uma estratégia interessante, com potencial de aplicação em terapias, vacinas e diagnósticos (Schutz, *et al.*, 2006). A fusão de proteínas de interesse à proteínas constitutivas do vírus como por exemplo a poliedrina, resulta na formação de um poliedro com alta concentração de proteína heteróloga. Outra vantagem do uso do baculovírus como carreador de antígenos é a fácil construção do vírus recombinante no sistema Bac-To-Bac (Luckow, *et al.*, 1993) como também a possibilidade de modificações pós-traducionais em células de inseto. Além de conseguir uma recombinação eficiente dos genes, os baculovírus também demonstraram estimular as respostas imunes antivirais do hospedeiro em células de mamíferos (Gronowski, *et al.*, 1999). Até o momento não existem trabalhos que avaliaram o papel independente do poliedro, então, neste trabalho avaliamos a capacidade dos poliedros do AcMNPV, sem a expressão de uma proteína heteróloga, em ativar DCs, contribuindo para o entendimento do seu potencial imunomodulador.

Abe *et al.* (2003) observaram que camundongos imunizados com baculovírus BV AcMNPV selvagem e recombinante, contendo a hemaglutinina fusionada à poliedrina, foram capazes de induzir uma resposta imune inata, com o aumento na produção de IL-6 e TNF- α além da produção de altos níveis de anticorpos específicos a hemaglutinina *in vivo*. Dentro deste contexto, para avaliar se os poliedros de AcMNPV são também capazes de ativar células da resposta imune inata, neste trabalho as BMDC foram estimuladas *in vitro* com os poliedros. Foi observado que após o reconhecimento do poliedro de AcMNPV pelas BMDCs de camundongos houve aumento da produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70 e aumento da expressão de IFN- α .

Resultados semelhantes foram observados em estudos que utilizaram BVs de

AcMNPV ao induzir um estado antiviral *in vivo* e *in vitro* com a produção de IFN- tipo I e citocinas inflamatórias em células de mamíferos e camundongos (Beck, *et al.*, 2000; Abe, *et al.*, 2003). Foi demonstrado nesses trabalhos que a ativação da resposta imune inata pelo BV de AcMNPV foi capaz de proteger os camundongos contra o vírus da influenza (Abe, *et al.*, 2003) e contra o vírus da encefalomiocardite (Gronowski, *et al.*, 1999). Os poliedros de AgMNPV também foram capazes de gerar imunomodulação ao aumentar a produção de TNF- α e IFN- γ em macrófagos peritoneais *in vitro* (Bocca, *et al.* 2013). No entanto, quando foi utilizado a ODV de AcMNPV, não observou-se a produção de TNF- α após de inoculação (Molina, *et al.*, 2016).

As DCs quando ativadas apresentam em sua superfície altos níveis de moléculas coestimulatórias (CD80, CD86), complexo principal de histocompatibilidade-II (MHC-II) e o receptor CD40, necessários para ativação de linfócitos T naíve (Steinman, 2012). No presente trabalho, os poliedros foram capazes de induzir a ativação das DCs. Molina, *et al.* (2016) também observaram, em estudo com BMDC, o aumento da expressão de CD86 e MHC-II quando estimuladas com BV do AcMNPV.

De uma forma geral, a infecção por vírus em células de mamíferos induz a estimulação de células da resposta imune inata com a produção de diferentes citocinas, além de IFN tipo I: IFN- α e IFN- β (Amanda, *et al.*, 2018). As infecções virais podem estimular diferentes vias de sinalização para a produção de IFNs tipo I e III, de forma a desenvolver ação antiviral, antiproliferativa e funções imunomoduladoras (Fensterl, *et al.*, 2015). No presente trabalho, foi observado que o poliedro aumenta a transcrição de mRNA do IFN- α o que representa uma atividade importante do seu uso em preparações, cuja finalidade será o aumento da resposta imune inata do hospedeiro em resposta à infecções virais.

Assim como os vírus apresentam ação imunomoduladora, outras substâncias como proteínas recombinantes, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas de origem microbiana estimulam a resposta imune humoral e celular. A partir do conhecimento da capacidade de determinada substância possui em ativar o sistema imunológico, é possível a sua utilização como imunomodulador, adjuvante ou substância carreadora de peptídeos antigênicos. Neste contexto, a flagelina é considerada um agonista de TLR5 (Turley, *et al.*, 2011; Tussey, *et al.*, 2016; Taylor, *et al.*, 2011) que promove a produção de citocinas inflamatória como o fator de necrose TNF- α , IL-6, IL-8 e óxido nítrico (Ciacci, *et al.*, 1998;

Ciacci, *et al.*, 1999; Mizel, *et al.*, 2003), pelas células da resposta imune inata. Além disso, é capaz de ativar linfócitos TCD4+ e linfócitos B da resposta imune adaptativa (McSorley, *et al.*, 2000; Gewirtz, *et al.*, 2001). Mediante as características acima citada sobre a ação que a flagelina tem sido proposto a sua utilização como adjuvante tanto no contexto de uma proteína de fusão como pela co-administração com antígeno (Liu, *et al.*, 2009; Taylor, *et al.*, 2011).

Os polissacarídeos também são amplamente estudados como imunomoduladores, devido a sua baixa toxicidade e suas propriedades terapêuticas (Schepetkin & Quinn, 2006; Wasser, 2002). Um exemplo, são as beta-glucanas do cogumelo da espécie *Ganoderma lucidum* que apresenta efeitos imunomodulatórios em células da resposta imune inata e na ativação da imunidade adaptativa (Berovic, *et al.*, 2003; Boh, *et al.*, 2007; Boh, *et al.*, 2013). Estudos observaram que macrófagos estimulados com *G. lucidum* aumentaram a fagocitose *in vivo* e *in vitro*, a produção de IL-1 α , TNF- α e produção de NO (Li, *et al.*, 2000; Lin, 2001; Jiang, *et al.*, 2003; Tang, *et al.* 2004). Atualmente, mais de cinquenta espécies de cogumelos apresentam propriedades relacionadas à ativação da resposta imunológica, cujos compostos obtidos podem ser das quatro categorias como as lectinas, terpenoides, proteínas e polissacarídeos (Enshasy e Hatti-Kaul, 2013).

Em relação aos imunomoduladores de origem sintética, o pidotimode (3-L piroglutamil – L- tiazolidine -4- ácido carboxílico) tem sido descrito como uma substância sintética que apresenta propriedades imunomoduladora tanto *in vitro* como *in vivo* (Coppi, *et al.*, 1990). O pidotimode induz a maturação de DC, aumenta a expressão de MHC-II e as moléculas coestimuladora, produção de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo a proliferação e diferenciação de células T para perfil Th1 (Auteri, *et al.*, 1992, Migliorati, *et al.*, 1994). Além disso, possui atividade antiviral mais efetivas em infecções respiratórias recorrentes em pacientes pediátricos (Aivazis, *et al.*, 2002). Estudos realizados com PBMC (Peripheral Blood Monocytes Cells) de humanos, visando investigar a atividade imunomoduladora de pidotimode em diferentes condições em pacientes que apresentam imunossupressão. Di Renzo, *et al.* (1997), analisaram a estimulação *in vitro* efeito do pidotimode na proliferação de PBMC de pacientes com câncer em comparação com doadores saudáveis. As PBMC de pacientes apresentaram uma atividade proliferativa significativamente menor em resposta a mitógenos, como concanavalina A, mas a adição de

pidotimode para as células significativamente aumentou o índice proliferativo. Além disso, a adição de pidotimode à cultura significativamente aumento da secreção de IL-2 por PBMC destes pacientes (Di Renzo, *et al.* 1997).

Comparando os dados apresentados neste trabalho, pode-se observar similaridade nos padrões de ativação da resposta imune apresentados por outros imunomoduladores avaliados em testes clínicos.

Os imunomoduladores, como extensamente descrito na literatura, têm como principal função a ativação de células da resposta imune inata, afim de proporcionar uma ativação efetiva da reposta imune adaptativa. A ativação da resposta imune inata é mediada por receptores de reconhecimento padrão, dentre eles os TLRs. Os TLRs influenciam em diferentes etapas da ativação de DC e da diferenciação de células T, sendo cruciais para o reconhecimento de microrganismos pelas DCs. As DCs mieloides expressam TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR8 e TLR9 que são importantes no reconhecimento de microrganismos induzindo o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e MHC-II (Iwasaki, *et al.*, 2004).

A sinalização dos TLR é dividida em dois processos que é dependente da molécula adaptadora envolvida com a molécula adaptadora fator de diferenciação mieloide (MyD88) e TRIF. A ativação via MyD88 é necessário para induzir a sinalização de vários TLRs, exceto TLR3, cuja sinalização é dependente de TRIF. A sinalização de TLR4 é dependente tanto de MyD88 como TRIF. Após a ativação de MyD88 e/ou TRIF, as proteínas de transdução de sinal são ativadas que culminam com a ativação dos fatores de transcrição NFκB, IRF-3 ou IRF-7, favorecendo a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e/ou de IFN-I (Takeuchi, *et al.*, 2010).

Neste presente trabalho foi observado que o poliedro também é capaz de induzir a via de sinalização intracelular com a ativação dos fatores de transcrição nuclear IRF3 induzindo a produção de IFN-I, semelhante ao observado em diferentes vírus (Oganesyan, *et al.* 2006; Kagan, *et al.* 2008). Outro resultado interessante foi que o poliedro também induziu aumento da expressão de TLR3 e TLR9 o que pode estar relacionado com a sua interação no endossoma após ser endocitado. O que representa uma vantagem para o seu uso como imunomodulador à resposta imune específica a microrganismos intracelulares, em especial aos vírus.

Os BVs de AcMNPV ativam células da resposta imune inata de mamíferos por meio da interação do receptor endossomal TLR9 via dependente e independente de MyD88 (Abe, *et al.*, 2005), corroborando com os dados obtidos neste trabalho. A ativação da célula de mamíferos via TLR9, pelos poliedros pode ser devido a interação da sequência CpG não metilada presente no DNA dos baculovírus (Ayres, *et al.*, 1994). A sequência CpG, agonista de TLR9, induz uma potente resposta imune humoral e celular contra antígenos coadministrados atuando como forte adjuvante (Bode, *et al.*, 2011). O DNA de fita simples viral é agonista de TLR9, enquanto o TLR3 é ativado quando detecta-se RNA de fita dupla (dsRNA), que é um intermediário na replicação dos vírus ssRNA. Ativação de DCs mediada por agonista de TLR3 não somente contribui para a indução da resposta imune inata e adaptativa contra patógenos (Salem, *et al.*, 2009).

Foi observado no presente trabalho que os poliedros além de induzir o aumento da transcrição de TLR3 e TLR9 eles favorecem a ativação das DCs pela interação com os TLR2 e TLR4. Observou-se que as DCs obtidas de animais nocautes para TLR2 e TLR4, quando estimuladas com poliedros, reduziram a produção de TNF- α , IL-6, IL-12p70 refletindo uma alteração em seu estado de ativação. A ausência de TLR-2 ocasionou uma menor produção de TNF- α , IL-6 e IL-12p70, demonstrando a importância deste receptor na interação com o poliedro e sugerindo-o como agonista de TLR2 e TLR4.

O TLR2 está envolvido no reconhecimento de PAMPs de bactérias, vírus e fungos (Akira, *et al.*, 2006). É interessante notar que o agonista de TLR2 o lipopeptídeo ativador de macrófagos -2 (macrophage-activating lipopeptide-2– MALP-2), semelhantemente ao poliedro, promove o aumento da produção de IL-6, TNF- α e IL-12 pelas DCs. O TLR2 também possui os agonistas sintéticos como o Pam2Cys e Pam3Cys. Estes agonistas correspondem a uma classe de lipoproteínas e lipopeptídeos di- ou triacilados bacterianos com resíduos de cisteína di- ou tripalmitoilados na porção N-terminal (Jin, *et al.*, 2007). O Pam3Cys, o Amplavec, é utilizado como adjuvante da vacina contra HPV (Ignacio, *et al.*, 2018), assim como na vacina auto-adjuvante de *Neisseria meningitidis*, ambas aprovada pela FDA (Luo, *et al.*, 2016; Fletcher, *et al.*, 2004).

No final da década de 90, iniciaram os estudos avaliando a fusão de proteínas de interesse aos Pam3Cys e Pam3CSK4 para produção de vacinas. Jung e colaboradores (1985), foram os primeiros a aplicar essa estratégia para a síntese de um conjugado antígeno-

adjuvante baseado em peptídeos (Jung, *et al.*, 1985). A conjugação de Pam3Cys a antígenos peptídicos aumenta a captação, processamento e apresentação do antígeno (Khan, *et al.*, 2007) e induz aumento da resposta imune humoral e celular (Ingale, *et al.*, 2007; Zom, *et al.*, 2014). Resultado semelhante ao encontrado com os poliedros do presente trabalho em que mesmo não expressão a proteína heretóloga, o poliedro foi capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral, o que possibilita sugerir a sua utilização como adjuvante fusionado a uma proteína de interesse.

No presente trabalho as DCs nocautes para TLR4 estimuladas com poliedro apresentaram redução de IL-6, TNF- α e IL-12p70, sugerindo a importância desse receptor na produção de citocinas estimuladas pelos poliedros. Estes poliedros foram capazes de induzir, em DCs, a ativação dos fatores de transcrição regulador de interferon 3 (IRF-3) e via NF- κ B que favorece assim como a via de sinalização Myd88 e TRIF, a produção de citocinas e maturação de DC e a transcrição de IFN- α (Didierlaurent, *et al.*, 2009; Casella, *et al.*, 2008).

Um outro agonista de TLR4, MLPA, foi liberado pelo FDA (Food and Drug Administration) desde 1998 como adjuvante na vacina de subunidade contra o vírus da hepatite B. Esse agonista tem a capacidade de ativar macrófagos e induzir a produção de diferentes citocinas inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento de uma resposta Th1 (Santos, *et al.*, 2006; Kawai, *et al.*, 2010).

Uma das propostas de utilização do baculovírus é fusionar a proteína heteróloga a poliedrina para favorecer o reconhecimento pelo sistema imunológico. Estratégia semelhante foi utilizada por Rudra, *et al.*, (2012) ao conjugar um epítipo de *Plasmodium falciparum* (NANP)3 ao domínio de auto-agregação de Q11 (nanofibra). A nanofibra fusionada ao epítipo induziu uma potente resposta humoral contra (NANP)3 (Rudra, *et al.*, 2012). No entanto, a coadministração de misturas de agonistas de TLR e antígenos pode não provocar respostas imunes desejadas, porque pode ocorrer a dissociação dos agonistas de TLR mais rapidamente após a injeção além de que é mais difícil a internalização de antígenos livres pelas APCs quando comparado com os antígenos fusionados aos agonistas. Já está bem estabelecido que a resposta imune inata quanto a adaptativa são geradas com maior eficiência quando os antígenos são fusionados covalentemente aos agonistas de TLR (Basto, *et al.*, 2012).

Conforme já mencionado, os TLRs apresentam um importante papel na indução da

resposta imune adaptativa (Barton, *et al.*, 2002; Pulendran, *et al.*, 2004). A ativação das DCs pode ser desencadeada pelos ligantes de TLRs que resultam na indução de um perfil de respostas Th1 ou Th2 (Qi, *et al.*, 2003). É observado que agonistas de TLR2 induz um perfil de resposta Th2 enquanto que agonistas de TLR4 favorece o perfil de resposta Th1. Neste trabalho o poliedro utilizando os receptores TLR2 e TLR4 foi capaz de induzir a maturação das DCs bem como favorecer a proliferação dos linfócitos T. Além disso, o poliedro favoreceu o desenvolvimento de resposta imune perfil Th1 com a presença de linfócitos T produtores de IFN- γ , assim como a produção *in vitro* de IL-17. Também houve a produção de IgG1 em alta concentração, caracterizando um perfil Th2.

No trabalho realizado por Brito, *et al.*, (2017), foi observado que a lectina derivada da planta *A. purpurata inflorescence* é um potente imunomodulador em células mononucleares do sangue periférico de humanos, com indução de uma resposta perfil Th1 e Th17, sugerindo sua aplicação na modulação da resposta imune. Por outro lado, as beta-glucanas que aumentam a expressão de moléculas de MHC-II, favorecem a ativação de linfócitos TCD4 perfil Th1, Th2 e T reguladora (Brito, *et al.*, (2017).

Neste trabalho foi observado que o poliedro de AcMNPV foi capaz de induzir aumento da resposta humoral com a produção de IgG1 e IgG2a, caracterizando o perfil de resposta mista Th2 e Th1. No entanto, observa-se que a produção de IgG1 foi consideravelmente maior quando comparado a produção de IgG2a, inferindo uma resposta imune humoral predominantemente Th2, embora não detectado na produção de IL-13. Por outro lado, Molina e colaboradores (2016) em seu trabalho com BV de AcMNPV, observaram a predominância do isotipo IgG2a contra OVA elicitado pelo esquema completo de imunização com BV-OVA, embora IgG1, IgG2b e IgG3 também foram detectados.

Barros, *et al.*, (2011), identificaram que após a inoculação intranasal, o AgMNPV recombinante expressando proteína E do vírus da febre amarela em camundongos Balb/c foi capaz de induzir um padrão de resposta com o perfil Th1. Por outro lado, Bocca *et al.*, (2013), observaram que camundongos imunizados via intranasal com AgMNPV e AcMNPV, apresentaram uma baixa capacidade em induzir uma resposta imunológica. No entanto, a forma AgMNPV reduzindo a formação do granuloma pulmonar em camundongos experimentalmente infectados com paracoccidiodomicose,

Considerando os trabalhos discutidos neste tópico, é possível considerar que os

poliedros de AcMNPV são capazes de interagir com células do sistema imunológico dos camundongos, tanto *in vitro* como *in vivo*, favorecendo a ativação de DCs com aumento de expressão de moléculas coestimulatórias e produção de citocinas, dependentes de TLR2 e TLR4. Essa ativação induziu a proliferação de linfócitos T *in vitro* com o desenvolvimento do perfil Th7. Além disso, nos experimentos *in vivo*, houve o favorecimento do desenvolvimento da resposta imune celular de perfil misto, Th1 /Th2 e resposta imune humoral com aumento da produção IgG2a e IgG1. Diante desses resultados, sugere-se que o poliedro de AcMNPV possui atividade imunomoduladora. Esta atividade está sumarizada na figura 28. No entanto, estudos mais aprofundados da sua caracterização e funcionamento biológico deverão ser realizados para que possam ser sugeridos como um adjuvante de formulações vacinais fusionados ou não com proteínas de interesse na área de saúde.

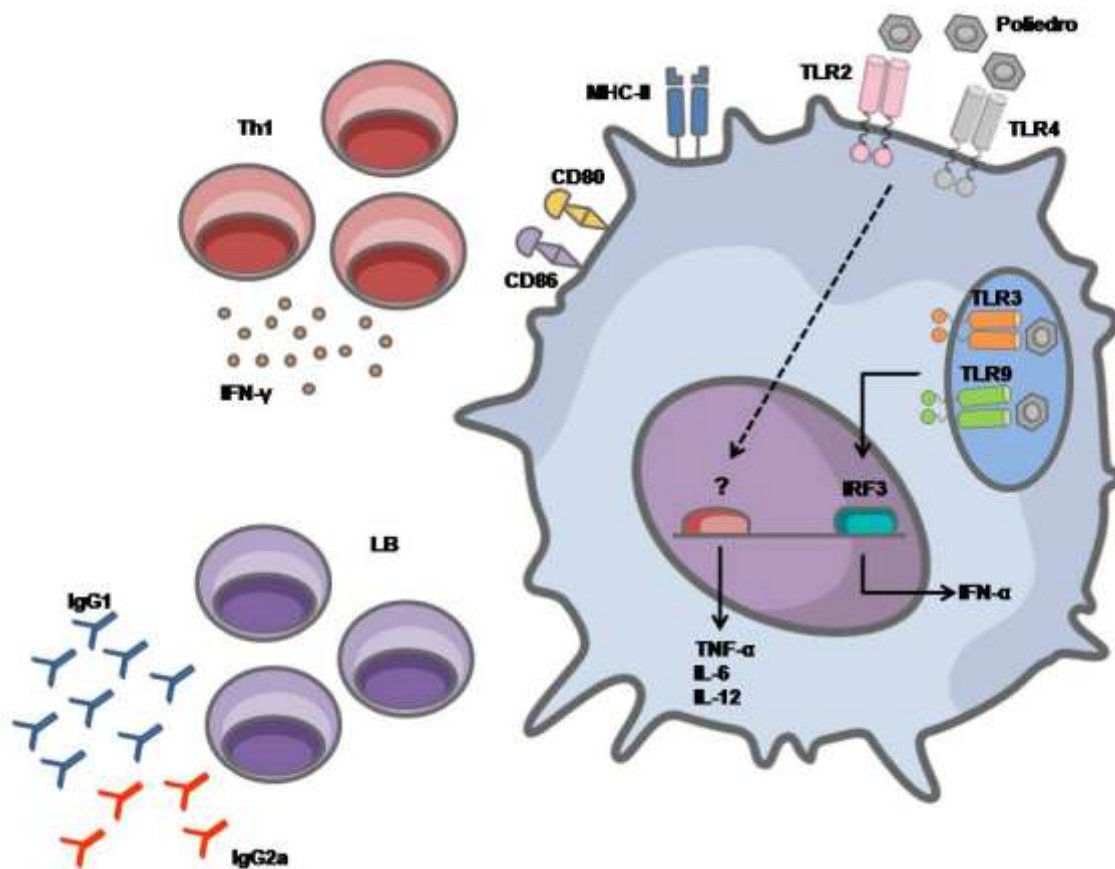


Figura 27. Modelo esquemático da sinalização do poliedro de AcMNPV em BMDC que favorece a proliferação de linfócitos T e B. Os poliedros interagem com os receptores TLR2 e TLR4 na superfície da BMDC que estimula via sinalização intracelular a produção de citocinas inflamatórias como: TNF- α , IL-6 e IL-12. Além disso, os poliedros podem interagir com os TLR3 e TLR9 receptores intracelulares induzindo via IRF3 a produção de IFN- α . Observa-se que as DCs quando ativadas pelo poliedro apresentam aumento da expressão de moléculas coestimulatórias (CD80, CD86) e MHC-II. As DCs ativadas são capazes de ativar os linfócitos T produtores de IFN- γ , assim como induzir a produção de anticorpos de IgG1 e IgG2.

6 CONCLUSÃO

De acordo com apresentado no presente trabalho o poliedro de AcMNPV foi capaz de induzir a maturação das DCs. A maturação das DCs pelos poliedros foi dependente de TLR2 e TLR4 o que favoreceu a ativação e a proliferação de linfócitos T. Foi também observado a produção de IgG1 e IgG2a, com aumento da concentração de IgG1. De acordo os resultados deste trabalho, podem-se inferir que o poliedro possui uma ação imunomoduladora capaz de induzir um perfil de resposta misto como Th1 e Th2, podendo ser aplicado em futuras aplicações imunoterápicas que requerem esses padrões de resposta imune.

7 REFERÊNCIAS

Abe, *et al.* Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. **Journal of virology**. n.79, v.5 pag.2847–58, 2005.

Akira, *et al.* Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**. n.124, pg.783–801, 2006.

Akira, *et al.* Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**. n2, pg.675–680, 2001.

Alexopoulou, *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**. n.413, pg.732–738, 2001.

Amanda, *et al.* The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. **Frontiers in Immunology**, 2018.

Ampie, *et al.* Heat shock protein vaccines against glioblastoma: from bench to bedside. **Journal Neuro-Oncology**. n.123, pg. 441–448, 2015.

Ardisson-Araújo, et al., New theraphosid Spider Toxin Causes Early Insect Cell Death by Necrosis When Expressed In Vitro during Recombinant Baculovirus Infection. **Plos One**, n.8, 2013.

Azmi F, Ahmad Fuaad AAH, Giddam AK, Batzloff MR, Good MF, Skwarczynski M, et al. Self-adjuvanting vaccine against group A streptococcus: Application of fibrillized peptide and immunostimulatory lipid as adjuvant. **Bioorganic Med Chem**. 2014;22(22):6401–8.

Ayres M.D. et al. The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. **Virology**. n.202, v. 2, 2003.

Baldrige, *et al.* Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. **Expert Opin. Biol. Ther**. n.4, pg.1129–1138, 2004.

Barton, et al. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. **Curr. Opin. Immunol**. v.14, pg.380–383, 2002.

Basto, et al. A new cloning system based on the OprI lipoprotein for the production of recombinant bacterial cell wall-derived immunogenic formulations. **J. Biotechnol**. n.157, v.1, pg. 50-63, 2012.

Beck, *et al.* Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes. **Gene Therapy**. n.7, pg.1274, 2000.

Bode, et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines*. n.10, pg499–511, 2011.

Cardozo, *et al.* Characterization and cytotoxic activity of sulfated derivatives of

polysaccharides from *Agaricus brasiliensis*. **Int J Biol Macromol**, 2013.

Carty, et al. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. **Clinical Experimental Immunology**. n.161, pg.397–406, 2010.

Chen, *et al.* A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design. **Vaccine**. n.27, pg.1400–1409, 2009.

Cheever, MA. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. **Immunological Reviews**. p. 357-368, 2008.

Chua, *et al.* Synthesis of toll-like receptor-2 targeting lipopeptides as self-adjuncting vaccines. **Methods Molecular Biology**. n.494, pg.247–61, 2008.

Deliyannis et al. Intranasal lipopeptide primes lung-resident memory CD8+ T cells for long term pulmonary protection against influenza. **Europe Journal Immunology**. n.36, pg.770–8, 2006.

Di, *et al.* The in vitro effect of pidotimod on some immune function in cancer patients. **Immunopharmacology Immunology**. n.19, pg. 37-51, 1997.

Dowling, et al. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. **Clinical Transl. Immunology**, 2016.

Duisit, *et al.* Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. **Journal Gene Medicine**. n.1, pg.93–102, 1999.

Fletcher, *et al.* Vaccine Potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 Lipoprotein. **Infection Immunology**. n.72, pg.2088–2100, 2004.

Gronowski, *et al.* Baculovirus stimulates antiviral effect in mammalian cells. **Journal Virology**. n.73, pg.944, 1999.

Hamley, *et al.* Toll-like receptor agonist lipopeptides self-assemble into distinct nanostructures. **Chem Commun**. v.50 n.100, pg.15948, 2014.

Herbas-Stubbs, *et al.* Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune response by inducing type I IFN. **Journal Immunology**. n.174, v4, pg.2361-9, 2007.

Iwasaki, *et al.* Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**. n. 5, pg.987-995, 2004.

Jackson, *et al.* A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2004.

Jarvis, *et al.* Baculovirus expression vectors. In The baculoviruses. **Springer**. pg.389-43, 1997.

Ji, *et al.* How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. **The EMBO journal**. n.29, pg.505-51, 2010.

Jin, *et al.* Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. **Cell**. n.130, pg.1071–1082, 2007.

Kagan, *et al.* TRAM couples endocytosis of Tolllike receptor 4 to the induction of interferon-beta. **Nature Immunology**. n.9, pg.361–368, 2008.

Kataoka, *et al.* Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. **Journal of Virology**. n.86, pg.2610–2620, 2012.

Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**. n.34, v.5, pg. 637–50, 2011.

Kawai, *et al.* The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**. n.1, pg.373–384, 2010.

Kolanowski *et al.* TLR4-mediated proinflammatory dendritic cell differentiation in humans requires the combined action of MyD88 and TRIF. **Innate Immunology**.n.20, pg.423–30, 2013.

Laakkonen, *et al.* Clathrin-independent entry of baculovirus triggers uptake of E. coli in non-phagocytic human cells. **PLoS ONE**. n. 4, pg.5093, 2009.

Lampkin, *et al.* Phase II Trial of a Complex PolyriboinosinicPolyribocytidylic Acid with Poly-L-lysine and Carboxymethyl Cellulose in the Treatment of Children with Acute Leukemia and Neuroblastoma: A Report from the Children's Cancer Study Group. **Cancer Res**. n.45, pg.5904–5909, 1985.

Liu G, *et al.* Immunogenicity and efficacy of flagellin-fused vaccine candidates targeting 2009 pandemic H1N1 influenza in mice. **PLoS ONE**. n. 6, pg.20928, 2011.

Louise, *et al.* Enhancing the immune stimulatory effects of cetuximab therapy through TLR3 signalling in Epstein-Barr virus (EBV) positive nasopharyngeal carcinoma. **Oncolimmunology**, 2018.

Long, G.; Pan, X.; Kormelink, R.; Vlak, J.M. Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **Journal of Virology**. n.80, pg.8830–8833, 2006.

Luckow, *et al.* Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in

Escherichia coli. **Journal of Virology**. n.67, pg. 4566–4579, 1993.

Luhrmann, *et al.* In vivo effects of a synthetic 2-kilodalton macrophage-activating lipopeptide of mycoplasma fermentans after pulmonary application. **Infection Immunology**. v.70, pg.3785–92, 2002.

Luo, *et al.* The Dual Role of Lipids of the Lipoproteins in Trumenba, a Self-Adjuvanting Vaccine Against Meningococcal Meningitis B Disease. **AAPS J**. v.18, pg.1562–1575, 2016.

Matilainen, *et al.* Baculovirus entry into human hepatoma cells. **Journal of Virology**. n.79, pg.15452–15459, 2005.

Marshak-Rothstein. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. **Nature Review Immunology**. n.6, pg.823, 2006.

Migliorati, *et al.* Immunomodulating activity of Pidotimod. **Arzneimittel forschung**. n.39, pg.1421–1424, 1994.

Miller, *et al.* The baculoviruses: Springer Science & Business Media. New York. 1993.

Oganesyan, *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. **Nature**. n.39, pg.208–211, 2006.

Pulendran, *et al.* Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. **Immunology Review**. n.199, pg.227–250, 2004.

Qi, *et al.* Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial Toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. **Infection Immunology**. n.71, pg.3337– 3342, 2003.

Reilly, *et al.* Baculovirus Expression Vector: A Laboratory Manual WH Freema And Company. New York. 1992.

Reppe, *et al.* Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v.40, pg.474–81, 2009.

Ribeiro, *et al.* Baculovírus para expressão de proteínas recombinantes e células de insetos. **In Biotecnologia Aplicada à Saúde**. Vol. 2, pg 255-306, 2015.

Rohrmann, *et al.* Polyhedrin structure. Journal of General Virology. n.67, pg.1499-1513, 1986.

Rohrmann, *et al.* 3rdEd edn. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US) George Rohrmann, 2013.

Rudra, *et al.* Immune responses to coiled coil supramolecular biomaterials. n.31v.32, 2010.

Shi, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. **Nature Immunology**. n.13, pg.255–263, 2012

Schutz A. et al. The Autographa californica nuclear polyhedrosis virus AcNPV induces functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **Vaccine**. V 24, pg. 7190-6, 2006.

Smith, et al. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and cellular biology**. pg.2156-2165, 1983.

Steinman, et al. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu Review Immunology** 30:1–22, 2012.

Tani, et al. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. **Virology**. n. 279, pg. 343–353, 2001.

Taylor, et al. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza–flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI). **Vaccine**. n.29, pg.4897–4902, 2011.

Tsujimoto et al. Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions. **Immunology Letter**. n.125, pg.114–118, 2009.

Turley, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e–flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. **Vaccine**. n.29, pg.5145–515, 2011.

Tussey, *et al.* Phase 1 Safety and Immunogenicity Study of a Quadrivalent Seasonal Flu Vaccine Comprising Recombinant Hemagglutinin-Flagellin Fusion Proteins. **Open Forum Infection Disease** n.15, pg.0150, 2016.

Van, *et al.* Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: Mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. **Journal Virology**. n.75, pg.961–970, 2001.

Van, et al. Thirty years of baculovirus insect cell protein expression: from dark horse to main stream technology. **Journal of General Virology**. n.96, pg.6-23, 2015.

Vicente-Suarez I, Brayer J, Villagra A, Cheng F, Sotomayor EM. TLR5 ligation by flagellin converts tolerogenic dendritic cells into activating antigen-presenting cells that preferentially induce T-helper 1 responses. **Immunology Letter**. n. 125, pg.114–118, 2009.

Zeng W, Ghosh S, Lau YF, Brown LE, Jackson DC. Highly immunogenic and totally synthetic lipopeptides as self-adjuvanting immunocontraceptive vaccines. **Journal Immunology**. n.169, pg.4905–12, 2002.

Zanotto, *et al.* Phylogenetic Interrelationships among Baculoviruses - Evolutionary

Rates and Host Associations. **Journal of Invertebrate Pathology**. n.62, pg.147-164, 1993.

Zeng, *et al.* Highly immunogenic and totally synthetic lipopeptides as self-adjuvanting immunocontraceptive vaccines. **Journal of Immunology**. n.169, pg. 4905–12, 2002.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMNPV - *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*
AgMNPV - *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus*
AP1 – Proteína ativadora 1
APC – Célula Apresentadora de antígeno
BMDC – *bone marrow derived dendritic cells*
BMDM – *bone marrow derived macrophages*
BV- Budded virus
CCL2 - ligante de quimiocina (motivo C-C) 2
CD80 - Cluster of differentiation 80
CD86- Cluster of differentiation 86
Células NK - células *Natural Killer*
C-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos
CO₂ – Dióxido de carbono
DC – Dendritic Cells
dsRNA – ácido ribonucleico de fita dupla
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
Glc – Glicose
GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e de macrófagos
GP64 – phosphoglycoprotein 64
GV – *Granulovirus*
HA - hemaglutinina A
HSP70 - proteína de choque térmico 70
IFN- γ - interferon gama
IL-1 β - interleucina 1 beta
IL-13 - interleucina treze
IL-6 – interleucina seis
IL-12p70 - interleucina doze subunidade p70
IL-1 α - interleucina um alfa
IL-1 β - interleucina 1 beta
IFN α – interferon alfa
IgG1 – Imunoglobulina G1
IgG2a - Imunoglobulina G2a
IKK- I κ B kinase
LDH - lactato desidrogenase
LPS - lipopolissacarídeos
MyD88 - Myeloid differentiation primary response 88
MIP2 - proteína inflamatória de macrófagos 2
MHC-II - Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II
M1 - macrófagos classicamente ativados

NF- κ B - factor nuclear kappa B
NPV – Nucleopolyhedrovirus
ng/mL - nanogramas por mililitro
nm – nanômetros
IRAKs - Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
NO – óxido nítrico
OB - Corpo de oclusão
ODV – vírus derivado da oclusão
PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos
PBS - Phosphate Buffered Saline
POL – Poliedro
PRR – Receptor Reconhecedor de Padrão
TCD4 - T Cluster of differentiation 4
TCD8 - T Cluster of differentiation 8
TLR2 - toll like receptor -2
TLR3 - toll like receptor -3
TLR4 - toll like receptor -4
TLR5 - toll like receptor -5
TLR6 - toll like receptor -6
TLR7 - toll like receptor -7
TLR9 - toll like receptor -9
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
VFSC - vírus da febre suína clássica
°C - graus Celsius
 μ L – microlitros
 μ g/mL – micrograma por mililitro
 μ M - micromolar

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 9.1 APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA) A REALIZAÇÃO DO PROJETO

ANEXO 9.2 ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS TCD4⁺ E CLINFÓCITOS TCD8⁺

ANEXO 9.3 ANALISE DE GEL DA EXTRAÇÃO DE RNA DE BMDC ESTIMULADAS COM POLIEDRO

ANEXO 9.4 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE TNF- α DE BMDC E BMDM ESTIMULADAS COM POLIEDRO

ANEXO 9.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BMDM ESTIMULADOS COM POLIEDRO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fenótipos de Baculovírus.....	10
Figura 2. O ciclo de infecção de um baculovírus do grupo nucleopoliedrovírus (NPV) em um hospedeiro lepidóptero.....	13
Figura 3. Visão geral da estrutura da poliedrina.....	15
Figura 4. Representações esquemáticas da organização dos poliedros.....	16
Figura 5. Modelo esquemático de internalização de baculovírus em células de mamíferos...17	
Figura 6. Os imunomoduladores são capazes de ativar células dendríticas e induzir a ativação de linfócitos TCD8+.....	19
Figura 7. Indução de uma resposta imune induzida por um imunomodulador	20
Figura 8. Localização celular de TLRs e a identidade de seus ligantes / agonistas.....	22
Figura 9. Microscopia eletrônica do poliedro de AcMNPV.....	25
Figura 10. Figura esquemática demonstrando os experimentos <i>in vitro</i> com BMDC e BMDM e cocultura de BMDC e linfócitos.....	27
Figura 11. Figura representa o esquema de imunização de camundongos Balb/c inoculados com uma suspensão de poliedro ou veículo apenas.....	33
Figura 12. Avaliação da viabilidade de BMDC estimuladas com poliedro.....	35
Figura 13. Avaliação da cinética de produção de TNF- α pelas BMDC estimuladas por poliedro.....	37
Figura 14. Internalização do poliedro pelas BMDC.....	37
Figura 15. Avaliação da produção de CCL2 (A), IL-1beta (B), IL-6 (C) e IL-12p70 (D) pelas BMDC estimuladas com poliedro.....	38

Figura 16. Avaliação da porcentagem de BMDC que expressam CD80 (A), CD86 (B), CD40 (C) e MHC-II (D) estimuladas com poliedro.....	39
Figura 17. Proliferação de linfócitos T em cocultura com BMDC estimuladas com poliedro.....	40
Figura 18. Número de células positivas marcadas com CD3+, CD4+ e CD8 em cultura com BMDC estimuladas com poliedro.....	41
Figura 19. Avaliação da produção de IL-17 e IL-13 pelos linfócitos em cocultura com BMDC estimuladas com poliedro.....	42
Figura 20. Figura 20. Avaliação da produção de TNF- α (A), IL-6 (B), IL-12p70 (C) por BMDC de camundongos selvagens (WT), camundongos nocautes para os receptores do tipo Toll 2 (TLR 2 -/-) e camundongos nocautes para os receptores do tipo Toll 4 (TLR 4 -/-), estimuladas com poliedro.....	43
Figura 21. Avaliação da produção de CCL2 por BMDC de camundongos selvagens, nocautes para os receptores do tipo Toll 2 (TLR 2 -/-) e camundongos nocautes para os receptores do tipo Toll 4 (TLR 4 -/-), estimuladas com poliedro.....	44
Figura 22. Proliferação de linfócitos T em cocultura com BMDC obtidas de camundongo selvagem WT, camundongos deficientes para os receptores do tipo Toll 2 (TLR2 -/-) e camundongos deficientes para os receptores do tipo Toll 4 (TLR4 -/-) estimuladas com poliedro.....	45
Figura 23. Expressão dos genes <i>IFN-α</i> (A), <i>NFκB</i> (B), <i>IRF3</i> (C), <i>TLR9</i> (D) e <i>TLR3</i> (E) de BMDC estimuladas com poliedro.....	46
Figura 24. Avaliação da proliferação de esplenócitos de camundongos imunizados com o poliedro ou não e estimulados <i>in vitro</i> com poliedro.....	47
Figura 25. (A) Avaliação da produção de TNF- α , IFN- γ e IL-13 pelos esplenócitos de camundongos Balb/c não imunizados (B) e esplenócitos de camundongos Balb/c imunizados com poliedro.....	48
Figura 26. Análise da produção de IgG2a e IgG1 no soro de camundongos selvagens (WT) imunizados com poliedro e	

PBS.....49

Figura 27. Modelo esquemático da sinalização do poliedro de AcMNPV em BMDC que favorece a proliferação de linfócitos T e B.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de Imunomoduladores e suas respectivas aplicações e fase clínica.....19

Tabela 2. Sequências de Oligonucleotídeos utilizados para a RT-qPCR.....29

Tabela 3. Condições de ciclagem da RT-qPCR.....30

8 ANEXOS

ANEXO 8.1. APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA) A REALIZAÇÃO DO PROJETO.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 22 de junho de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE IN VITRO E IN VIVO AS PROTEÍNAS DOS VIRUS DENGUE, VIRUS CHIKUNGUNYA E VIRUS ZIKA EXPRESSAS POR BACULOVÍRUS.", Protocolo n.º 45/2017, sob responsabilidade da Professora Anamélia Lorenzetti Bocca foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Camundongo Balb/c (108 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/06/2017 a 31/05/2021.



Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA - UnB



ANEXO 8.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BMDM ESTIMULADOS COM POLIEDRO

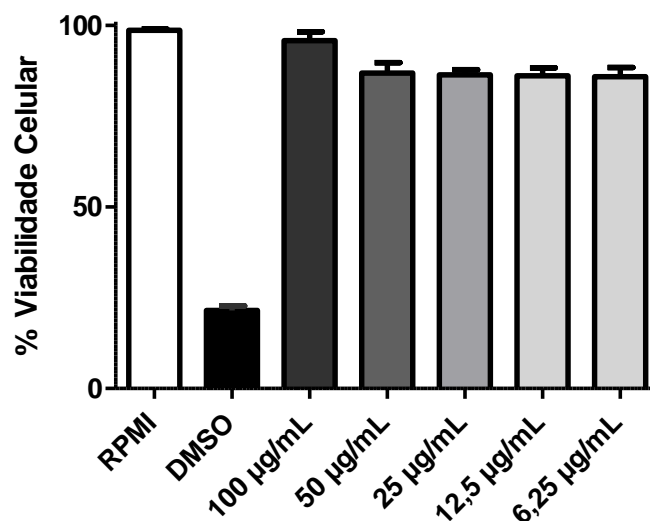


Figura S1. Avaliação da viabilidade de BMDM estimulados com poliedros. Os BMDC foram estimulados com poliedros nas concentrações: 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 7,25 µg/mL, período de 24 horas para o controle positivo foi adicionado DMSO e controle negativo apenas RPMI com Soro fetal bovino a 10%. Posteriormente, foi coletado o sobrenadante para a dosagem de TNF- α . Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. ANOVA análise de variância $p < 0.05$.

ANEXO 8.3. DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE TNF- α DE BMDC E BMDM ESTIMULADAS COM POLIEDRO

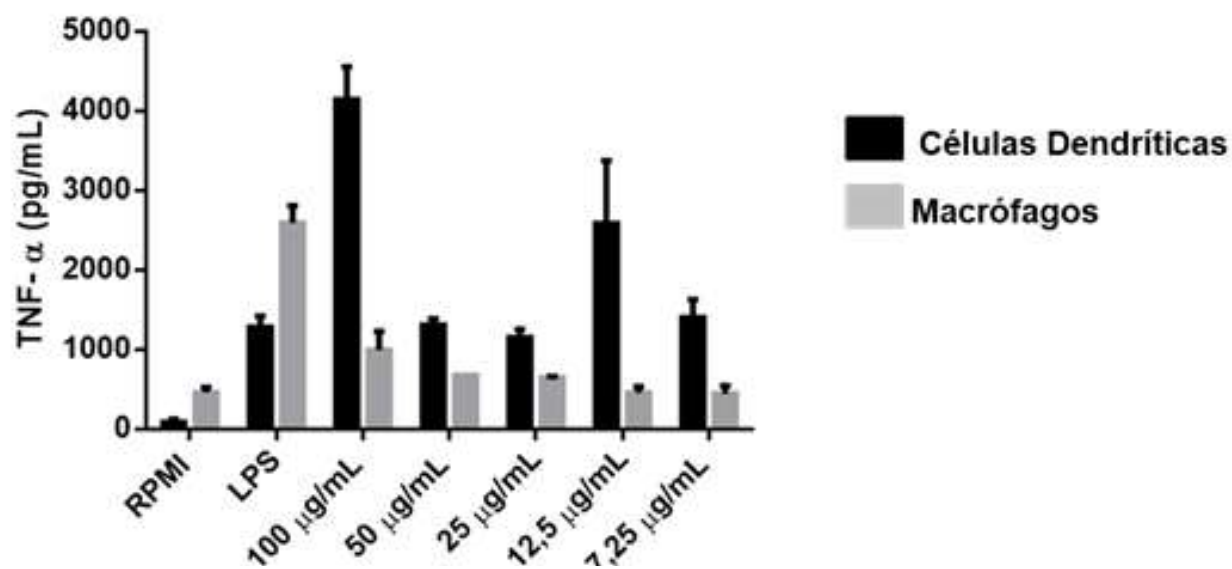


Figura S2. Concentração de TNF- α produzido por células dendríticas e macrófagos do tipo I estimuladas com poliedro. As BMDC e MO foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) e poliedro nas concentrações 100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL e 7,25 μ g/mL. Sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas para dosagem de TNF- α . Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

ANEXO 8.4. ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS TCD4+ E LINFÓCITOS TCD8+

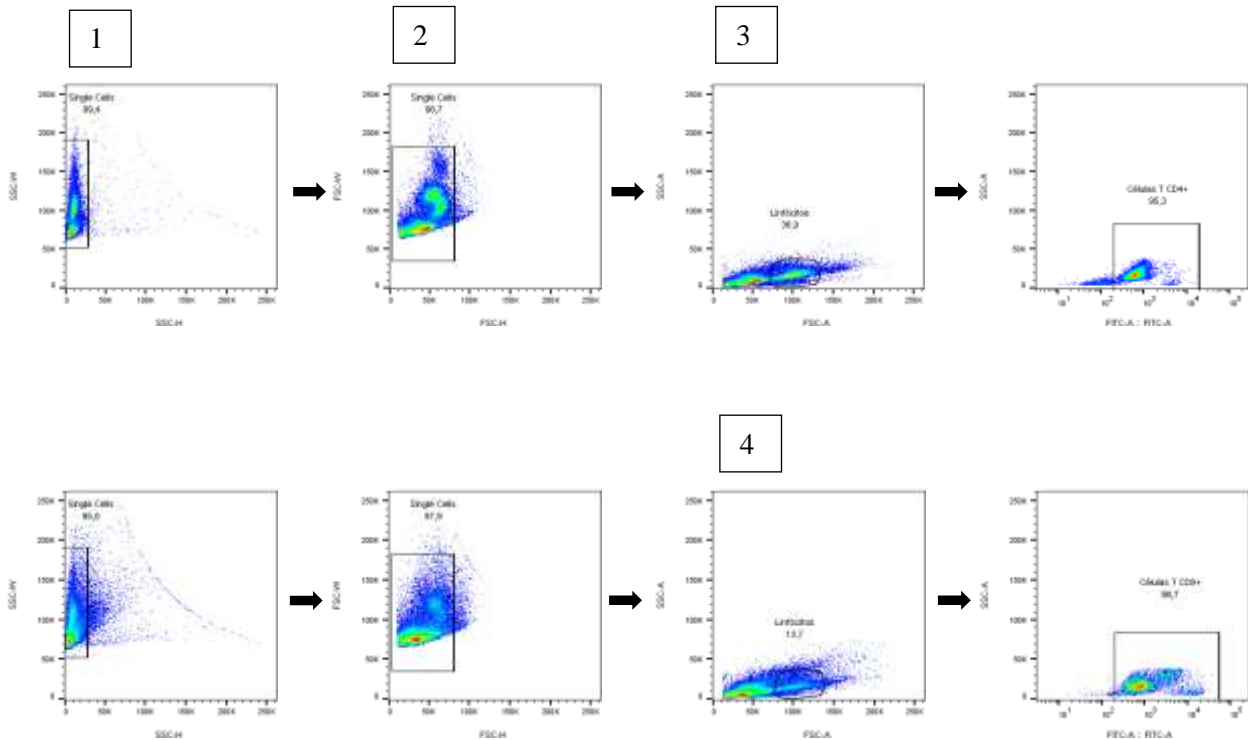


Figura S3. Estratégia de seleção usado para análise da subpopulação de linfócitos TCD4+ e TCD8+. Para a estratégia de seleção de células positivas foram (1) selecionadas população de células de acordo com tamanho e granulosidade para o tipo celular (BMDC) (SSC-A vs FSC-A), (2) excluídos os doublets (grupos de células) (FSC-A vs FSC-W), (3) selecionados células positivas para CD4+, (4) selecionados células positivas para CD4+, o mesmo parâmetro e utilizado para todos os tratamentos.

ANEXO 8.5. ANALISE DE GEL DA EXTRAÇÃO DE RNA DE BMDC ESTIMULADAS COM POLIEDRO.



Figura S4. Extração de RNA de BMDC estimuladas com poliedro. As BMDC foram estimuladas com LPS, Pam3 e poliedro. O tempo de estímulo foi de 6 horas. 1- BMDC em meio RMPI, 2- BMDC estimuladas com LPS (1 μ g/mL), 3- BMDC estimuladas com Pam3 (300mg/mL) e 4 BMDC estimuladas com Poliedro (12,5 μ g/mL).

